

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

SARAH ROMANI ORTOLAN

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DO METABOLISMO DE CARBONO E
NITROGÊNIO E DE RESPOSTAS AO ESTRESSE NA ASSOCIAÇÃO DE TRIGO
COM A BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae***

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2015

SARAH ROMANI ORTOLAN

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DO METABOLISMO DE CARBONO E
NITROGÊNIO E DE RESPOSTAS AO ESTRESSE NA ASSOCIAÇÃO DE TRIGO
COM A BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa

Coorientadores: Prof. Dra. Marise Fonseca dos Santos

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

078a	Ortolan, Sarah Romani Avaliação de parâmetros do metabolismo de carbono e nitrogênio e de respostas ao estresse na associação de trigo com a bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> / Sarah Romani Ortolan. – Marechal Cândido Rondon, 2015. 53 p. Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa Coorientadores: Prof ^a Dr ^a Marise Fonseca dos Santos Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2015. 1. Trigo. 2. Fertilizantes nitrogenados. I. Costa, Antonio Carlos Torres. II. Santos, Marise Fonseca dos. III. Guimarães, Vandeir Francisco. IV. Título. CDD 22.ed. 633.11 631.84 CIP-NBR 12899
------	--

Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini-Leitzke CRB-9/539

SARAH ROMANI ORTOLAN

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DO METABOLISMO DE CARBONO E
NITROGÊNIO E DE RESPOSTAS AO ESTRESSE NA ASSOCIAÇÃO DE
TRIGO COM A BACTÉRIA *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE***

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, para obtenção do título
de Magister Scientiae.

APROVADA: 28 de julho de 2015



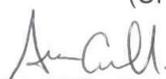
Prof.^a Dr.^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo
(UFPR)



Prof. Dr. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira
(UNIOESTE)



Prof.^a Dr.^a Marise Fonseca dos Santos
(Coorientadora)
(UFPR)



Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa
(Orientador)
(UNIOESTE)

À minha família e ao meu marido que estão sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis e que me ajudaram, acreditaram e sempre investiram em mim todas as suas forças e expectativas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu criador e guia, a luz durante essa etapa. Por estar sempre ao meu lado a cada momento, nas dificuldades e nas alegrias e por ter me dado força para supera-lás.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao PPGA pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Torres das Costa, pela sua orientação, dedicação e sugestões ao longo da realização do mestrado.

Aos professores do Programa de Mestrado pelos ensinamentos, em especial Antonio Carlos Torres da Costa, Edmar Soares de Vasconcelos, Fabíola Villa, José Barbosa Duarte Júnior, José Renato Stangarlin, Odair José Kuhn, Vandeir Francisco Guimarães, Eurides Kuster Macedo.

À UFPR Setor Palotina, pelo espaço cedido para realização do experimento na casa de vegetação, em especial ao LABIOGEN, pela concessão dos materiais e equipamentos, infraestrutura e por possibilitar a minha capacitação, principalmente as coorientadoras Prof. Dra. Marise Fonseca dos Santos e Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo, pelos ensinamentos, incentivo, amizade, companheirismo e dedicação, mostrando sempre o caminho certo a ser seguido, ajudando e amparando nos momentos mais difíceis e por acreditarem em mim. Obrigada por estarem sempre junto nesta jornada e principalmente pela convivência e confiança.

À COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola pela concessão dos materiais experimentais.

Aos amigos, equipe LABIOGEN, Andressa Estevam, Camila Gazola Volpiano, Lorrana Flores e Amanda Külzer, com quem convivi durante esses dois anos e que estavam sempre ao meu lado nos momentos difíceis. Obrigada pelo carinho, amizade e pelos momentos de descontração.

Aos meus pais Leacir Romani e Vilma Trentini Romani, que me deram a vida, que são meus guias e meus protetores. Pelo apoio durante toda essa etapa, ajuda e colaboração. Por estarem comigo nos momentos mais difíceis, rezando por mim e principalmente me estendendo a mão.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos que estavam sempre ao meu lado e que me ajudaram a superar mais essa etapa.

Ao meu marido Gustavo, pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e ajuda nesse momento da minha vida. Obrigada principalmente pela paciência e pelo apoio recebido durante os momentos de mais dificuldade.

E a todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

ORTOLAN, Sarah Romani, Magister Scientiae, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Julho – 2015. **Avaliação de parâmetros do metabolismo de carbono e nitrogênio e de respostas ao estresse na associação de trigo com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*.** Orientador: Antonio Carlos Torres da Costa. Coorientadores: Marise Fonseca dos Santos e Vandeir Francisco Guimarães.

O trigo é considerado o principal cereal da dieta da população mundial, entretanto nos últimos anos tem se obtido pouco ganho de produtividade desta cultura apesar de se ter aumentado o uso de fertilizante nitrogenado. O uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal, como *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 entre outras, tem sido estudado para se obter desenvolvimento de plantas com menor uso de fertilizantes nitrogenados. Entretanto existem poucas informações que relacionam os efeitos desta interação no desenvolvimento da planta e de produtividade de grãos. Objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo de carbono e nitrogênio através de algumas enzimas, metabólitos e índices relacionados à resposta ao estresse infeccioso em trigo das cultivares CD 104 e CD 120 em associação com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* em dois estádios fenológicos. Foram realizados dois experimentos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, com 4 repetições, em esquema fatorial 4x2. O primeiro fator refere-se às condições de inoculação com bactéria e/ou fertilização nitrogenada em cobertura, sendo: controle, sem inoculação com bactéria ou adição de fertilizante nitrogenado (C); aplicação de fertilizante nitrogenado ($50 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) após 30 dias da semeadura (N); inoculação de 10^6 células da bactéria *H. seropedicae*/semente na semeadura (Hs) e inoculação com a bactéria combinada com a aplicação de fertilizante nitrogenado (Hs + N) e o segundo fator refere-se aos estádios fenológicos (perfilhamento e emborrachamento). Os resultados indicaram que a inoculação com *H. seropedicae* em sementes de trigo das cv.s CD 104 e CD 120 nos dois estádios fenológicos responderam em relação aos índices relacionados ao estresse com envolvimento das enzimas do metabolismo de carbono e nitrogênio. Entretanto não foi percebido efeito proeminente de promoção do crescimento vegetal no final do desenvolvimento do trigo, tampouco efeito deletério da inoculação de bactéria para a cv. CD 104, nas condições experimentais. Para a cv. CD 120 os efeitos diferenciais indicam menor nível de estresse e algum nível de associação para efeito positivo na produtividade quando combinada a inoculação da bactéria com a fertilização nitrogenada. Foi possível concluir que assim como para agentes patogênicos e estressantes, a *H. seropedicae*, capaz de associar benéficamente com trigo também apresenta padrão semelhante de interferência do metabolismo de carbono e nitrogênio e índices de estresse.

Palavras-chave: Bactérias promotoras do crescimento vegetal. Glutamina sintetase. Glutamato desidrogenase. Isocitrato desidrogenase. Prolina. Fenilalanina amônia liase.

ABSTRACT

ORTOLAN, Sarah Romani, Magister Scientiae, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, July – 2015. **Evaluation of carbon and nitrogen metabolism parameters and responses to stress in wheat association with bacteria *Herbaspirillum seropedicae***. Advisor: Antonio Carlos Torres da Costa. Co-Advisors: Marise Fonseca dos Santos and Vandeir Francisco Guimarães.

Wheat is considered the main cereal diet of the world population, but in recent years has achieved some gain in productivity of this culture despite having increased the use of nitrogen fertilizer. The use of plant growth promoting bacteria such as *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 among others has been studied to obtain development of plants with less use of nitrogen fertilizers. However there is little information relating the effects of this interaction in plant development and grain yield. Objective of this study was to evaluate the carbon and nitrogen metabolism by certain enzymes, metabolites and indices related to the response to infectious stress on the wheat cultivars CD 104 and CD 120 in association with *Herbaspirillum seropedicae* bacteria. Two experiments were conducted. The experimental design was completely randomized with four replications in a 4x2. The first factor relates to the conditions inoculation with bacteria and/or nitrogen source in coverage are: control without inoculation with bacteria or added nitrogen fertilizer (C); application of nitrogen fertilizer ($50 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) 30 days after sowing (N); inoculation with 10^6 cells of the bacterium *H. seropedicae*/seed at planting (Hs) and inoculation with bacteria combined with the application of nitrogen fertilizer (Hs + N) and the second factor refers to the phenological stages (tillering and booting). The results indicated that inoculation with *H. seropedicae* in wheat seeds of cv.s CD 104 and CD 120 in the two growth stages answered in relation to the indices related to stress with the involvement of enzymes of carbon and nitrogen metabolism. However prominent effect was not noticed to promote plant growth of wheat in late development, nor a deleterious effect of the bacterium for inoculation cv. CD 104 under the experimental conditions. For cv. CD 120 the differential effects indicate lower levels of stress and some level of association to positive effect on productivity when combined inoculation of bacteria to nitrogen fertilization. It was concluded that as well as pathogenic and stressors, *H. seropedicae* able to beneficially associate with wheat also provides similar interference pattern of carbon and nitrogen metabolism and stress levels.

Keywords: Plant growth promoting bacteria. Glutamine synthetase. Glutamate dehydrogenase. Isocitrate dehydrogenase. Proline. Phenylalanine ammonia lyase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Atividades específicas das enzimas glutamina sintetase, GS (mmols γ glutamilhidroxamato/s.mg ptn) x 10^6 (A); glutamato desidrogenase no sentido da aminação redutiva, GDH-NADH (mmols NAD^+ /s.mg ptn) x 10^7 (B); isocitrato desidrogenase NADP dependente, ICDH- NADP (mmols NADPH/s.mg ptn) x 10^7 (C) e fenilalanina amônia liase, PAL (mols Ác. Cinâmico/mgptn.min) x 10^4 (D) nas fases do perfilhamento e emborrachamento do trigo cv. CD 104 nas condições, controle (sem inoculação ou fertilização) (C); aplicação de fertilizante nitrogenado (N); inoculação com bactéria *H. seropedicae* (Hs) e inoculação com a mesma bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N)..... 20
- Figura 2: Conteúdo de prolina ($\mu\text{mols/g p.f}$) (A); ácido glioxílico ($\mu\text{mols de Ác. Gliox/g p.f}$) x 10^4 (B); % nitrogênio total (% NT) (C) e amônia ($\mu\text{mols de NH}_4^+$ /g p.f) (D) nas fases do perfilhamento e emborrachamento do trigo cv. CD 104 nas condições, controle (sem inoculação ou fertilização) (C); aplicação de fertilizante nitrogenado (N); inoculação com bactéria *H. seropedicae* (Hs) e inoculação com a mesma bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N)..... 21
- Figura 3: Atividades específicas das enzimas glutamina sintetase, GS (mmols γ glutamilhidroxamato/s.mg ptn) x 10^6 (A); glutamato desidrogenase no sentido da aminação redutiva, GDH-NADH (mmols NAD^+ /s.mg ptn) x 10^7 (B); isocitrato desidrogenase NADP dependente, ICDH- NADP (mmols NADPH/s.mg ptn) x 10^7 (C) e fenilalanina amônia liase, PAL (mols Ác. Cinâmico/mgptn.min) x 10^4 (D) nas fases do perfilhamento e emborrachamento do trigo cv. CD 120 nas condições, controle (sem inoculação ou fertilização) (C); aplicação de fertilizante nitrogenado (N); inoculação com bactéria *H. seropedicae* (Hs) e inoculação com a mesma bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N)..... 24
- Figura 4: Conteúdo de prolina ($\mu\text{mols/g p.f}$) (A); ácido glioxílico ($\mu\text{mols de Ác. Gliox/g p.f}$) x 10^4 (B); % nitrogênio total (% NT) (C) e amônia ($\mu\text{mols de NH}_4^+$ /g p.f) (D) nas fases do perfilhamento e emborrachamento do trigo cv. CD 120 nas condições, controle (sem inoculação ou fertilização) (C); aplicação de fertilizante nitrogenado (N); inoculação com bactéria *H. seropedicae* (Hs) e inoculação com a mesma bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N)..... 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes da produção do trigo cv. CD 104 em diferentes condições de inoculação e/ou fertilização.....	26
Tabela 2: Componentes da produção do trigo cv. CD 120 em diferentes condições de inoculação e/ou fertilização.....	26

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 - Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)	3
2.1.1 - <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	4
2.2 - Metabolismo de Carbono e Nitrogênio em Plantas	5
2.2.1 - Enzimas do metabolismo de carbono e nitrogênio	6
2.3 - Estresse em plantas	9
2.3.1 - Ácido glioxílico	9
2.3.2 - Prolina	10
2.3.3 - Fenilpropanóides	11
3 - MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 - Cultivo em Viveiro	13
3.2 - Manutenção e Cultivo da Bactéria <i>H. seropedicae</i> SmR1	14
3.3 - Avaliação das atividades enzimáticas: Glutamina Sintetase, Glutamato Desidrogenase – NADH, Isocitrato Desidrogenase – NADP e Fenilalanina Amônia Liase (PAL)	14
3.4 - Avaliação do Conteúdo de Prolina	15
3.5 - Avaliação do Ácido Glioxílico e Amônia	16
3.6 - Determinação de Nitrogênio Total (NT)	16
3.7 - Componentes da Produção	17
3.8 - Análise Estatística.....	17
4 - RESULTADOS	18
4.1 - Avaliações de parâmetros do metabolismo de carbono e nitrogênio e de respostas ao estresse	18
4.1.1 - CD 104	18
4.1.2 - CD 120	22
4.2 - Componentes da produção.....	26

5 - DISCUSSÃO.....	28
5.1 - Parâmetros do metabolismo de carbono e nitrogênio e de respostas ao estresse	28
5.2 - Componentes da produção.....	36
6 - CONCLUSÃO	38
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 - INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) constitui uma das bases da dieta humana, sendo, portanto de grande interesse agrônômico o estudo de fatores que contribuam no baixo custo e alta produtividade desta cultura. Durante o último século o incremento de produtividade teve como principal fator a utilização excessiva de fertilizantes nitrogenados (HIREL et al., 2011).

Para que haja aumento na produtividade e também no conteúdo proteico deste cereal, deve haver um aumento da absorção de nitrogênio inorgânico (SAUBIDET et al., 2002; DÍAZ-ZORITA e FERNÁNDEZ-CANIGIA, 2009). Isso está relacionado a um aumento proporcional na utilização de fertilizantes nitrogenados, já que depois da água, o nitrogênio vem a ser o nutriente que mais limita a produtividade de trigo, considerado o elemento mineral mais abundante nas plantas, fazendo parte da composição de moléculas e inúmeras enzimas (DONATO e ANDRADE, 2004).

A aplicação excessiva de fertilizante nitrogenado leva principalmente a graves consequências ambientais negativas (ROBERTSON e VITOUSEK, 2009), sendo que cerca de 65% do adubo nitrogenado é perdido no sistema solo-planta através das emissões gasosas, escoamento, erosão e lixiviação, causando severo impacto ambiental (BHATTACHARJEE et al., 2008) o que aumenta o gasto na produção deste cereal.

Devido aos custos ambientais e econômicos gerados pela fertilização nitrogenada, tem se estimulado a busca de novas alternativas que venham a diminuir a utilização de fertilizante, mas sem afetar a diminuição da produção. Uma das alternativas é a utilização de bactérias, que além de fixar nitrogênio podem promover o crescimento vegetal (Plant Growth Promoting Bacteria – PGPB) (RONCATO-MACCARI et al., 2003), por meio de processos como síntese de fitohormônios (auxinas e citocininas), promoção da absorção de compostos para o crescimento da planta, tais como fosfato e ferro (SPAEPEN et al., 2008; FARINA et al., 2012; ROJAS-TAPIAS et al., 2012), e de promoverem também o crescimento de cereais, quando estão sobre condições abióticas de estresse (EGAMBERDIEVA e KUCHAROVA, 2009).

A eficiência da interação associativa varia entre cultivares de uma espécie de planta e é dependente de vários fatores. Já tendo sido observado para milho (ROESCH et al., 2006), trigo (SALA et al., 2005), arroz (MANO e MORISAKI, 2008) e cana-de-açúcar (MUNOZ-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003) diferentes respostas dos genótipos frente à interação associativa. Entretanto, poucos estudos existem a cerca da expressão e atividade de

enzimas do metabolismo de nitrogênio e carbono nos diferentes genótipos e tampouco as diferentes respostas sob a condição de interação associativa com bactérias.

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* tem um potencial de associação íntima com cereais (RONCATO-MACCARI et al., 2003) e essa associação íntima e benéfica, como para outras bactérias e também fungos micorrízicos requer reconhecimento mútuo e coordenação de respostas da planta e do micro-organismo (ZAMIOUDIS e PIETERSE, 2012). Plantas quando inoculadas com PGPB, tem habilidade para adquirir estado de indução de resistência sistêmica (Induced Systemic Resistance - ISR) a patógenos, preparando o sistema imune inato da planta, conferindo resistência uma grande variedade de patógenos, minimizando impacto no crescimento e rendimento (VAN HULTEN et al., 2006). As plantas respondem e percebem sinais de estresse, tal como, seca, salinidade, calor, herbivoria e patógenos (HIRT, 2009), e apresentam respostas comuns, incluindo a produção de certas proteínas e ajustamento do metabolismo primário (ZELICOURT et al., 2013).

A associação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal são alvos de estudo (ÇAKMAKÇI et al., 2014). Por isso se faz necessário conhecer melhor e investigar essa interação e como ela pode interferir no metabolismo de carbono e nitrogênio e se esta causa de alguma maneira uma situação de estresse à planta ao longo do seu desenvolvimento. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo de carbono e nitrogênio através de algumas enzimas, metabólitos e índices relacionados à resposta ao estresse infeccioso em trigo das cultivares CD 104 e CD 120 em associação com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* em dois estádios fenológicos.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)

O solo está cheio de formas microscópicas de vida, como bactérias, fungos, actinomicetos, protozoários e algas, dentre estes, as bactérias são os micro-organismos mais comuns (GLICK, 2012). Tem se tornado conhecido durante algum tempo que o solo apresenta uma grande quantidade de bactérias (aproximadamente cerca de 10^8 a 10^9 células por grama de solo) e que o número de células bacterianas que são cultiváveis em solo é de apenas cerca de 1% do número total de células presente (SCHOENBORN et al., 2004).

Independentemente da quantidade de bactérias em uma amostra de solo, as bactérias podem afetar as plantas de três maneiras (GLICK, 2012). A partir da perspectiva da planta, a interação entre as bactérias do solo e das plantas podem ser benéficas, prejudiciais ou neutras (LYNCH, 1990). Um exemplo dessas bactérias que estão presentes no solo e são capazes de interagir benéficamente com plantas, são as bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) (BASHAN e HOLGUIN, 1998) que estão associadas com muitas ou se não todas, as espécies de plantas, e são comumente encontradas em vários ambientes (COMPANT et al., 2005).

No grupo das PGPB e que utilizam o mesmo mecanismo de promoção de crescimento vegetal, podemos incluir aquelas que são de vida livre, que vivem em relações simbióticas específicas com plantas, bactérias endofíticas que colonizam internamente algum ou uma porção de tecido de uma planta e as cianobactérias (GLICK, 2012). Essas bactérias podem promover o crescimento vegetal de duas formas, diretamente, geralmente por facilitarem a aquisição de recursos ou modulação nos níveis de hormônios vegetais, ou indiretamente, pela diminuição dos efeitos inibidores de vários agentes patogênicos no crescimento e desenvolvimento da planta, atuando assim como bactérias biocontrole (GLICK, 1995; AHMAD et al., 2008).

Os mecanismos de biocontrole dessas bactérias são amplamente conhecidos, como competição por um nicho ecológico ou substrato, produção de aleloquímicos inibitórios e indução de resistência sistêmica em plantas hospedeiras para um amplo espectro de agentes patogênicos (GLICK, 1995; HAAS et al., 2000; BLOEMBERG e LUGTENBERG, 2001; LUGTENBERG et al., 2001; HAAS et al., 2002; RYU et al., 2004) e/ou estresses abióticos (NOWAK e SHULAEV, 2003; MAYAK et al., 2004).

2.1.1 - *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum, é um gênero afiliado filogeneticamente ao *Betaproteobacteria* (ROTHBALLER et al., 2006). Esta foi descrita primeiramente como a espécie *Herbaspirillum seropedicae*, sendo a primeira espécie endófito a ser identificada (BALDANI et al., 1986). Depois deste evento, outros membros do gênero foram incluídos como a *H. rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996), *H. frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001) e a *H. lusitanum* (VALVERDE et al., 2003). Outras novas espécies de bactérias diazotróficas endofíticas também foram descritas, como *H. hiltneri*, isolada de plantas de trigo (ROTHBALLER et al., 2006).

Dentre os organismos que foram listados até o momento, todos apresentam a capacidade de fixar N₂ atmosférico, mas conforme os últimos dados taxonômicos, não se pode mais considerar uma característica comum dentro do gênero *Herbaspirillum*. Há outras bactérias que foram incluídas no gênero *Herbaspirillum* por causa de seu parentesco bioquímico e filogenético (SCHMID e HARTMANN, 2003), apesar de a maioria dos isolados não fixarem N e não serem de origem vegetal (*H. chlorophenicum*, *H. putei*, *H. autotrophicum* e *H. huttiense*), destas, somente a *H. putei*, apesar de não fixar N em condições laboratoriais, apresentou o gene *nifH* (ROTHBALLER et al., 2006).

Em relação às espécies colonizadoras de raízes do gênero *Herbaspirillum*, estas foram detectadas não apenas na superfície da raiz, mas também intra e intercelularmente (ROTHBALLER et al., 2006), demonstrando assim que parecem preferir as plantas da família das gramíneas como hospedeiro, apesar de terem sido encontradas em outras espécies (BALDANI e BALDANI, 2005). Quanto ao isolamento de estirpes de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* inoculadas em solo foi demonstrado que é possível se isolar essas estirpes, somente na presença da planta hospedeira, provavelmente devido à liberação de substâncias promotoras de crescimento na rizosfera, proporcionado pelas plantas (OLIVARES et al., 1996; BALDANI e BALDANI, 2005).

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica, gram-negativa e que é capaz de estabelecer associações endofíticas (BALDANI et al., 1997), pode ser isolada de muitas gramíneas, tais como sorgo, milho, arroz, cana-de-açúcar e de várias plantas forrageiras cultivadas no Brasil, assim também como o trigo (BALDANI e BALDANI, 2005).

2.2 - Metabolismo de Carbono e Nitrogênio em Plantas

O nitrogênio é um componente importante das proteínas que constrói células materiais e tecidos de plantas (MOKHELE et al., 2012), sendo requerido para síntese de aminoácidos, ácido nucleicos, proteínas, clorofilas, lipídeos e uma grande variedade de moléculas que contém N em sua estrutura (KUSANO et al., 2011). A assimilação de nitrogênio em esqueletos de carbono representa um processo fisiológico de grande importância para o crescimento e desenvolvimento da planta. O nitrogênio inorgânico pode ser assimilado em aminoácidos, como glutamato, glutamina, asparagina que são responsáveis por desempenhar um papel crucial como compostos transportadores de N em plantas (LEA e MIFLIN, 2003).

Estudos atualmente indicam que as plantas possuem um mecanismo intrínseco de regulação que é capaz de coordenar a capacidade de assimilação de nitrogênio com o metabolismo de carbono, disponibilidade de nutrientes e outros fatores ambientais, e as exigências colocadas pelo desenvolvimento e crescimento da planta. Por isso, a disponibilidade de substratos, metabólitos e produtos são importantes contribuintes para controlar a expressão de genes e atividade de enzimas-chave, permitindo a coordenação de assimilação de carbono (C) e nitrogênio (N). Esse controle da interação de C e N constitui uma rede muito complexa, envolvendo sinais que são emanados a partir de nitrato, amônio e conteúdos de metabólitos de nitrogênio, como glutamato, glutamina e aspartato, bem como sinais do metabolismo de C (STITT e KRAPP, 1999; CORUZZI e ZHOU, 2001; MILLER et al., 2008).

Além disso, o carbono (C) e o metabolismo de N estão firmemente coordenados nos processos fundamentais que permitem o crescimento da planta, como por exemplo, a fotossíntese e a absorção de N (CORUZZI e BUSH, 2001; THUM et al., 2003; URBANCZYK-WOCHNIAK e FERNIE, 2005; GUTIERREZ et al., 2007).

Interações complexas através de redes de vias bioquímicas de metabólitos estão presentes em muitos aspectos do metabolismo de N, envolvendo absorção e regulação e sua redução e sinalização de N, metabolismo e transporte de aminoácidos, interações entre o metabolismo N e C e a translocação e remobilização de nitrogênio (SCHEIBLE et al., 2004; DIAZ et al., 2008; MILLER et al., 2008; VIDAL e GUTIÉRREZ, 2008; KROUK et al., 2010). Alguns metabólitos primários como (aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos) tal como metabólitos secundários (fenilpropanóides) são componentes de redes complexas de vias bioquímicas no metabolismo da planta (KUSANO et al., 2011).

2.2.1 - Enzimas do metabolismo de carbono e nitrogênio

Em trigo, são realizados vários estudos fisiológicos e agrônômicos para identificar os passos limitantes para controle da absorção de N, assimilação e reciclagem durante o crescimento e desenvolvimento da planta (KICHEY et al., 2006; LOPES et al., 2006). Dentre as enzimas que fazem parte do metabolismo de carbono e nitrogênio estão, glutamina sintetase, glutamato desidrogenase NAD(H) dep e a isocitrato desidrogenase NADP(H) dep.

Na literatura já está bem estabelecido que plantas superiores fazem assimilação de nitrogênio inorgânico em orgânico através da reação catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS, E.C. 6.3.1.2). A enzima GS catalisa a condensação dependente de ATP de íons amônio com ácido glutâmico produzindo glutamina (CREN e HIREL, 1999; BARKER e BRYSON, 2007; TAIZ e ZEIGER, 2009). Esta enzima funciona associada à enzima glutamato-2-oxaloglutarato aminotransferase, também conhecida como glutamato sintetase (Fed-GOGAT, E.C. 1.4.7.1 ou NADH-GOGAT, E.C. 1.4.7.1.4) (ABIKO et al., 2005).

Nas células das plantas superiores, a assimilação de nitrogênio é compartimentada entre o citosol e o cloroplasto, em relação a diferentes fontes de amônio. As fontes primárias de amônio incluem a captação direta de amônio (NH_4^+) através do solo e vinda redução de nitrato e N_2 atmosférico, sendo este último feito por micro-organismos fixadores no interior da planta. As fontes secundárias consistem do catabolismo de aminoácidos seguido pela degradação de proteína, ciclo da fotorespiração de nitrogênio e a produção de amônio pela fenilalanina amônia liase e asparagina (BERNARD e HABASH, 2009).

Na maioria das espécies de plantas, a GS ocorre como uma isoforma isolada em plastídios (GS2) e de três a cinco isoformas localizadas no citosol (GS1) (SWARBRECK et al., 2011; THOMSEN et al., 2014). A GS1 citossólica é muito importante em raízes, principalmente na assimilação primária de NH_4^+ , e também para reassimilação e reciclagem do NH_4^+ que é gerado durante a degradação da proteína em folhas ou em processos catabólicos particularmente importantes na necessária mobilização do nitrogênio para os grãos em desenvolvimento. Enquanto que o papel principal atribuído da GS2 está na reassimilação da NH_4^+ oriunda da fotorespiração nos cloroplastos e assimilação da NH_4^+ derivada da redução de NO_3^- nos plastídios (WALLSGROVE et al., 1987; THOMSEN et al., 2014). Estudos mostraram que a GS2 é predominante no mesófilo das folhas, durante o estado vegetativo (fora do período reprodutivo) e seu nível decresce como progresso da senescência e degradação dos cloroplastos (BERNARD et al., 2008).

Em trigo foram estudadas as isoformas de GS e foram detectadas 10 sequências de GS, sendo destas três GS2 (a, b e c) e três GS1 (a, b e c). Foi observada também que em folhas maduras de trigo o transcrito de GS2 e da proteína mudam coordenadamente, sugerindo que a principal forma de regulação de GS2 é a nível de RNA mensageiro (BERNARD et al., 2008).

A atividade da GS depende da fonte de nitrogênio fornecido para a planta: íons nitrato (NO_3^-) ou íons amônio (NH_4^+). Este último elevaria os níveis de GS na raiz, mas este aumento não é intenso, pois a atividade da enzima depende da GOGAT e é dependente do fornecimento contínuo de fonte de carbono e energia na forma de ATP. O fornecimento de fonte de energia viria de células fotossintetizantes ou da respiração celular. A fonte de carbono é controversa. O 2-oxoglutarato ou α -cetoglutarato (2-OG) substrato da GOGAT tem origem discutida na literatura. As possibilidades de origem deste metabólico são diversas, podendo se originar das enzimas isocitrato desidrogenase NAD dep (mitocondrial), da isocitrato desidrogenase NADP dep citoplasmática ou plastidial, da ação da enzima aspartato aminotransferase AspAT (HODGES, 2002) ou de glutamato desidrogenase NAD dep (ROBINSON et al., 1991). Há indicação de que, a isocitrato desidrogenase seja a principal fonte de carbono para a fixação (GÁLVEZ et al., 1999). Além disso, essa enzima está envolvida na produção de NADPH, que é um poder redutor que pode promover resistência em situações de estresse oxidativo (MHAMDI et al., 2010).

A enzima glutamato desidrogenase é responsável por catalisar *in vitro*, a aaminação reversível do 2-oxoglutarato ou α -cetoglutarato (2-OG) para glutamato (Glu) (PURNELL et al., 2005).

Antes da descoberta do ciclo da glutamina sintetase/glutamato sintetase (GS/GOGAT), a glutamato desidrogenase em plantas vasculares era considerada a principal via de assimilação de amônio (NH_4^+). A partir de 1974, muitas experiências foram feitas para definir o papel da GDH, mas este papel tem permanecido elusivo, devido às dificuldades na determinação da direção da reação da GDH *in vivo*. No entanto, há evidência que a GDH atua na direção anabólica (na síntese de glutamato), podendo reassimilar uma pequena quantidade de amônio fotorespiratório e/ou auxiliar na assimilação de muitos amônios exógenos (PURNELL et al., 2005). Entretanto se a GDH opera na direção catabólica, esta enzima pode atuar abastecendo o ciclo do ácido cítrico de intermediários para ser retirado em outro ponto sobre condições de falta de carbono e/ou ajudar no balanço celular de carbono e nitrogênio (MIFLIN e HABASH, 2002; DUBOIS et al., 2003).

A glutamato desidrogenase pode também atuar como uma enzima responsiva ao estresse na detoxificação de altas concentrações de amônia e na produção de glutamato para síntese de prolina sob condições de estresse (ZHOU et al., 2015). Entretanto, pode se esperar que a GDH funcione no sentido de desaminação em tecidos que estão convertendo aminoácidos em compostos de transporte com uma baixa relação de carbono/nitrogênio, por exemplo, na germinação de sementes e em folhas senescentes (MIFLIN e HABASH, 2002).

Estudos exaustivos na tentativa de elucidar o papel da GDH-NAD(H) em folhas de tabaco indicam que esta enzima é um importante componente da regulação da razão carbono e nitrogênio, pois está intimamente associada com a homeostase de glutamato (TERCÉ-LAFORGUE et al., 2013).

A atividade da glutamato desidrogenase já foi relacionada a resistência ao estresse, como por exemplo, em folhas de tabaco, onde durante o ataque do patógeno e por efeito de estresse por hormônios e espécies reativas de oxigênio a atividade foi alterada (PAGEAU et al., 2006).

Se a origem do 2-OG for citoplasmática em direção ao cloroplasto, vindo do sentido catabólico da GDH possivelmente a enzima que atuaria no ciclo do ácido cítrico seria a isocitrato desidrogenase citoplasmática, que é NADP-dependente (ICDH-NADP; EC 1.1.1.42). Esta é responsável por catalisar a descarboxilação oxidativa da isocitrato por 2-OG com a produção da redução da coenzima NADPH (GÁLVEZ e GADAL, 1995).

NADPH é considerado um cofator chave no redox celular homeostático, sendo um indispensável doador de elétrons em diversas reações enzimáticas, processos de detoxificação, na resposta ao estresse oxidativo e vias biossintéticas. Apesar de não sofrer alteração de atividade na presença de H_2O_2 , sua atividade é reduzida na presença de glutatona reduzida. (LETERRIER et al., 2012). Foi observado também que na senescência, enquanto que a quantidade de proteína total diminui a quantidade total expressa de ICDH-NADP permanece estável indicando fornecimento contínuo de 2-OG o que possivelmente está relacionado à assimilação de amônio.

Em plantas superiores, a atividade desta enzima, isocitrato desidrogenase NADP-dependente tem sido detectada e também caracterizada em distintos compartimentos subcelulares, incluindo alguns como, citosol, mitocôndria, peroxissomos e cloroplastos (GÁLVEZ e GADAL, 1995; LETERRIER et al., 2007; PASCUAL et al., 2008; MCCARTHY-SUÁREZ et al., 2011).

Um significativo processo está sendo alcançado em busca de compreender como a ICDH-NADP está envolvida na mobilização de nitrogênio, na regulação redox e na resposta

para o estresse oxidativo (SCHEIBLE et al., 2000; HODGES et al., 2003; VALDERRAMA et al., 2006; MATEOS et al., 2009; MHAMDI et al., 2010; SULPICE et al., 2010).

O amônio (utilizado daqui em diante sem distinguir o gás de amônia e íons de amônio), seja resultante da assimilação do nitrato ou de outras fontes secundárias, é incorporado pela primeira vez dentro da glutamina na reação catalisada pela glutamina sintetase (GS, E.C. 6.3.1.2) (TOBIN e YAMAYA, 2001).

A amônia pode ser assimilada na glutamina ou glutamato, e estes translocam nitrogênio orgânico a partir de fontes que estão alocadas em leguminosas e não leguminosas, podendo ser incorporada dentro de aminoácidos, glutamina/glutamato usando esqueletos de carbono produzidos por outras vias metabólicas, por exemplo, a respiração e fotossíntese (FRECHILLA et al., 2002; ESPOSITO et al., 2005; WICKERT et al., 2007; MOKHELE et al., 2012).

Dentro da planta, a amônia pode ser gerada por uma diversidade de vias metabólicas, tal como, fotorespiração, metabolismo de fenilpropanóides, utilização do transporte de compostos nitrogenados e catabolismo de aminoácidos (HIREL e LEA, 2011; VALENTINE et al., 2011).

2.3 - Estresse em plantas

O estresse em plantas pode ser causado de várias maneiras, através de patógenos (PAGEAU et al., 2006), salinidade (WANG et al., 2007), níquel (GAJEWSKA e SKLODOWSKA, 2009), radiação, estresse hídrico e cádmio (KOVÁCS et al., 2014) e por calor e seca (APRILE et al., 2013) e todas as reações de assimilação no cloroplasto, incluindo a fixação do CO₂ que apresentarem redução em suas atividades. Isto leva a um acúmulo de equivalentes de redução, o que causará aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species – ROS). O transportador de malato e a lançadeira do malato/aspartato do cloroplasto e a ação das isoenzimas da malato desidrogenase transferem o poder redutor para o citoplasma em condições de estresse (KINOSHITA et al., 2011), podendo assim atender a atividade ICDH-NADP.

2.3.1 - Ácido glioxílico

O excesso de luz, por exemplo, pode atingir de modo prejudicial a fotossíntese através dos processos como foto-inibição (reversível) e foto-oxidação (irreversível). A foto-inibição

envolve danos aos centros de reação, especialmente FSII, quando eles são sobre-excitados. O que acontece no FSII é a perda da proteína envolvida na transferência de elétrons entre P680 e PQ, a qual pode ser recuperada posteriormente. A foto-oxidação é um processo irreversível e envolve diretamente os pigmentos receptores de luz. Quando estes absorvem muita luz e ficam muito tempo em estado molecular excitado interagem com o O₂, produzindo radicais livres, como superóxido (O₂⁻), o qual pode destruir as membranas dos cloroplastos. Há algumas defesas bioquímicas, como a enzima superóxido dismutase (SOD) que remove os radicais livres, mas essas defesas são insuficientes se a exposição à alta luminosidade for prolongada (KLUGE et al., 2015).

A fotorespiração é um mecanismo que as plantas realizam para mitigar os efeitos da foto-inibição ou foto-oxidação. Na situação onde a concentração de CO₂ intercelular está reduzida, essa via é intensificada também. Glioxalato é um metabólito intermediário desta via no metabolismo da enzima rubisco (carboxylase ribulose-1,5-bifosfato oxigenase; E.C 4.1.1.39), ou seja, primeiramente a ribulose-1,5-bifosfato é oxigenada a glicolato-2-fosfato, o qual será oxidado no peroxissoma para glioxalato. O glioxalato, por sua vez sofre transaminação para glicina, que será convertida em serina na mitocôndria, liberando amônia e CO₂ (ALLAN et al., 2009).

Assim a fotorespiração em plantas C3 dissipa mais de 25% do carbono fixado. Desta forma apresentada, a fotorespiração aparenta ser um processo desperdicioso. Entretanto, esse mecanismo auxilia na mitigação em algumas situações de estresse, como altos níveis de luz, seca e estresse salino (KOZAKI e TAKEBA, 1996; HOSHIDA et al., 2000; WINGLER et al., 2000).

2.3.2 - Prolina

As plantas para lidar com condições ambientais adversas e ataques a patógenos desenvolveram múltiplas vias de sinalização (JONES e DANGL, 2006). Níveis de metabólitos secundários, como por exemplo, os fenilpropanóides são controlados devido a estímulos ambientais (PAYYAVULA et al., 2012). Plantas também respondem ao estresse e acumulam alterações nos níveis de metabólitos, tais como prolina e, certas atividades específicas de vias metabólicas são alteradas (SHARMA et al., 2011).

As plantas em seu ambiente sempre confrontam com vários estresses abióticos e bióticos. Como consequência as plantas para sobreviverem dependem de sua habilidade de

rapidamente ajustar sua fisiologia, desenvolvimento e crescimento para escapar ou diminuir os impactos causados pelo estresse (ZELICOURT et al., 2013).

A prolina é um aminoácido multifuncional e também uma molécula sinalizadora que atua como um regulador de crescimento, desencadeando uma cascata de processos de sinalização (YANG et al., 2009), atuando como um osmólito (regulador da pressão osmótica) em plantas. Seus níveis são variáveis contra diferentes estresses (HARE e CRESS, 1997; SZABADOS e SAVOURÉ, 2009; YANG et al., 2009; YILDIZ e TERZÍ, 2013).

Para as plantas, a prolina tem sido considerada importante para o metabolismo primário, por desempenhar um papel crucial para o metabolismo celular, atuando tanto como um componente de proteínas e como aminoácido livre (LEHMANN et al., 2010), servindo como fonte de carbono e nitrogênio na célula (KISHOR et al., 2005). Sua acumulação como um soluto tem sido descrita como em alta concentração relacionada a plantas de maior tolerância a condições ambientais adversas incluindo alta salinidade, metais pesados, seca, alta luminosidade e irradiação UV (SLEATOR e HILL, 2001; BARTELS e SUNKAR, 2005; LEHMANN et al., 2010; KRASENSKY e JONAK, 2012).

É bem estabelecida que a maior expressão das enzimas de síntese deste metabólito transforma a planta em tolerante ao estresse (VENDRUSCOLO et al., 2007). Um maior nível de prolina em um número razoável de plantas cultivadas em estresses abióticos tem sido extensivamente relatado e revisado (JALEEL et al., 2007; MANIVANNAN et al., 2007; GIANNAKOULA et al., 2008; LEHMANN et al., 2010).

2.3.3 - Fenilpropanóides

Os fenilpropanóides contribuem em todos os aspectos para respostas da planta em relação ao estímulo biótico e abiótico (VOGT, 2010), não são somente indicadores de resposta de estresse em plantas sobre tratamento de agentes minerais e/ou diferentes variações de luz, mas são também os principais mediadores da resistência das plantas para pragas (LA CAMERA et al., 2004).

Compostos fenilpropanóides são precursores de uma ampla gama de compostos fenólicos com diversas funções nas plantas (HUANG et al., 2010) e funções importantes nas várias diferentes vias, como, na defesa da planta contra patógenos e predadores, na comunicação e transdução de sinal com outros organismos, na proteção por irradiação UV e como moléculas regulatórias (DIXON e PAIVA, 1995; FERRER et al., 2008; VOGT, 2010).

Os fenilpropanóides são derivados do ácido cinâmico que é formado a partir de uma fenilalanina. A enzima fenilalanina amônia liase (Phenilalanine ammonia lyase - PAL; EC 4.3.1.5) catalisa a desaminação não-oxidativa da fenilalanina para ácido trans-cinâmico. Esta via é precursora de fenilpropanóide e outros importantes hormônios que se apresentam no estresse relacionado à patogenicidade, como ácido salicílico, por esta razão é uma enzima conhecida como proteína de resposta ao estresse (HUANG et al., 2010; VOGT, 2010).

A atividade da PAL é induzida em resposta a vários estímulos tais como danos/injúrias a tecido, ataque de patógenos, luz, baixas temperaturas e hormônios. O reforço da resposta endógena se dá através de enzimas e proteínas de inúmeros sistemas conhecidas por proteínas de resposta a patogenicidade (Pathogen related proteins – PR proteínas). A PAL é uma destas, que também responde pela indução do florescimento em plantas, aumentando sua atividade (PHIMCHAN et al., 2014; WADA et al., 2014).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Cultivo em Viveiro

O experimento foi realizado em viveiro experimental coberto por sombrite na Universidade Federal do Paraná – UFPR, localizada no município de Palotina, Paraná, Brasil, no período de abril a setembro de 2014, em vasos plásticos com aproximadamente 10 kg de solo previamente peneirado. O solo utilizado foi um LATOSSOLO VERMELHO, com as seguintes propriedades químicas: pH 5,10; P = 4,27 mg dm⁻³; K = 0,29 cmol dm⁻³; Ca²⁺ = 4,19 cmol dm⁻³; Mg²⁺ = 1,28 cmol dm⁻³; H+Al = 6,43 cmol dm⁻³; Al³⁺ = 0,00; Cu = 11,30 mg dm⁻³; Mn = 56,00 mg dm⁻³; Fe = 45,20 mg dm⁻³; Zn = 4,00 mg dm⁻³; MO = 24,61 g dm⁻³; CTC = 12,19 cmol dm⁻³; SB = 5,76 cmol dm⁻³. Com base nos resultados foi realizada a adubação de base com 400 kg.ha⁻¹ de NPK (4-20-20) e calagem com calcário dolomítico, na quantidade de 10 g por vaso.

Foram avaliadas duas cultivares de trigo, CD 104 e CD 120 provenientes do programa de melhoramento da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – COODETEC, Cascavel/PR.

Foram realizados dois experimentos, um com a cv. CD 104 e outro com a cv. CD 120. Para cada experimento foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 4x2, com quatro repetições. O primeiro fator refere-se às condições de inoculação com bactéria e/ou fertilização nitrogenada em cobertura: controle, sem inoculação com bactéria e sem adição de fertilizante nitrogenado (C); adição de fertilizante nitrogenado em cobertura (N); inoculação com bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) e inoculação com a bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N), e o segundo fator refere-se aos estádios fenológicos (perfilhamento e emborrachamento).

Nas condições de inoculação com a bactéria as sementes antes de serem semeadas foram embebidas em solução salina para que houvesse 10⁶ células da bactéria de *H. seropedicae* SmR1 por semente.

Nas condições de adição de fertilizante nitrogenado foi usado sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ na quantidade de 50 kg.ha⁻¹ de N aplicado em cobertura, no estágio de perfilhamento (30 dias após a semeadura).

Os vasos foram dispostos aleatoriamente e foram semeadas 9 sementes por vaso. Após a emergência foi realizado o desbaste, deixando-se cinco plantas por vaso.

3.2 - Manutenção e Cultivo da Bactéria *H. seropedicae* SmR1

A bactéria *H. seropedicae* SmR1 foi mantida por sucessivas passagens em meio sólido em placa NFb – Malato e mantidas em estufa de crescimento a 28 °C. O inóculo foi preparado retirando-se uma colônia da bactéria e transferindo-a para um pré-inóculo. Este foi preparado com 5 mL de meio DIGS (MOUTIA et al., 2003) em tubos falcon de 50 mL e mantidos a 28 °C a 120 rpm em uma incubadora Shaker. Após 24 h, o crescimento foi quantificado por turbidimetria em 600 nm. Para o preparo do inóculo 1,0 mL de pré-inóculo, com aproximadamente 1,0 unidade de densidade ótica (D.O), foi transferido para erlenmeyer contendo 50 mL de meio NFb – Malato líquido por aproximadamente 22 h. O cultivo foi utilizado para inoculação nas sementes de trigo quando atingiu a fase exponencial do crescimento pela medida da turbidez. Quantidade suficiente de bactérias foram tomadas por centrifugação e o pelete diluído em volume suficiente de solução salina para que em 10 µL estivesse contido 10^6 células/semente de *H. seropedicae* SmR1.

3.3 - Avaliação das atividades enzimáticas: Glutamina Sintetase, Glutamato Desidrogenase – NADH, Isocitrato Desidrogenase – NADP e Fenilalanina Amônia Liase (PAL)

O extrato para dosagem das atividades das enzimas glutamina sintetase (GS, E.C. 6.3.1.2), glutamato desidrogenase NADH (GDH NADH, E.C. 1.4.1.2) e isocitrato desidrogenase NADP (ICDH NADP, E.C. 1.1.1.42), foi preparado com alterações (REIS et al., 2009). A massa fresca de folha (0,5 g) foi pesada para macerar em N₂ líquido com 1,5 mL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 7,6, EDTA 5 mM, 1 mM PMSF, 2 mM β-mercaptoetanol e 10% de glicerol). Depois de macerado, foi realizada adição de mais 2 mL de tampão de extração. Após, o macerado foi centrifugado a 20.000 g/10 min/4 °C por três vezes.

A atividade GS foi determinada pela medida da velocidade de formação do γ-glutamilhidroxamato (ácido glutâmico-γ-mono-hidroxi-amato) pela substituição do íon amônio por hidroxilamina (NH₂OH) na reação de formação de glutamina (BERNARD et al., 2008). O ensaio da atividade da amostra foi realizado com 50 mM de Tris-HCl, 80 mM de ácido glutâmico, 6 mM de NH₂.OH.HCl, 25 mM de cisteína, 20 mM de Mg.Cl₂.6H₂O, 8 mM de

ATP, água e extrato. Para o ensaio da atividade do branco, os constituintes foram o mesmo, mas sem adição de ATP.

A atividade da GDH-NADH foi realizada pelo decaimento progressivo da absorbância a 340 nm do NADH, substrato da reação (WANG et al., 2007). O ensaio da atividade foi realizado com 100 mM de Tris-HCl, 100 mM de NH₄Cl, 15 mM de α -cetoglutâmico, 0,9 mM de CaCl₂, 0,2 mM de NADH, água e extrato. Para o ensaio do branco, não foi acrescentado o extrato e o NADH. O início da reação se deu com a adição do extrato enzimático.

A atividade ICDH-NADP foi realizada pelo aumento progressivo da absorbância pelo aparecimento na reação de NADPH como produto (LETERRIER et al., 2012). O ensaio da atividade foi realizado com 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de ácido isocítrico, 2 mM de MgCl₂, 0,8 mM de NADP, água e extrato. Para o ensaio, primeiro foi colocado o extrato para o branco da reação, e a reação iniciada com a adição de NADP⁺.

O extrato para determinação da atividade fenilalanina amônia liase foi realizado com modificações (KOVACIK e KLEJDUS, 2012). 0,6 g de peso fresco de folhas foram macerados em 4 ml de tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,8, 2 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoetanol com 0,4 g de polivinilpirrolidona (PVPP) e o homogeneizado foi imediatamente centrifugado a 12.000 g/15 min/4 °C. A determinação da atividade consistiu da mistura de 1600 μ L do tampão borato de sódio, 600 μ L de fenilalanina 50 mM. Os reagentes foram incubados por 5 minutos a 40 °C. A reação foi iniciada com adição do extrato (100 μ L) e permaneceu incubada por 1 hora. A reação foi paralisada pela adição de 100 μ L de HCl 6 N. O branco foi feito sem a adição de fenilalanina. A quantidade de ácido trans-cinâmico produzido foi determinada a 275 nm. A curva padrão foi realizada com 0,006 a 0,030 n° mmols de ácido trans-cinâmico nas condições do ensaio.

Todos os extratos dos ensaios enzimáticos tiveram a concentração de proteínas determinada pelo método de Lowry modificado (HARTREE, 1972) usando a Albumina do Soro Bovino (Fração V – BSA) em triplicada de cada amostra e o branco usando o tampão de extração de cada ensaio.

3.4 - Avaliação do Conteúdo de Prolina

A quantidade de prolina foi determinada com algumas alterações (BATES et al., 1973). 0,5 g de tecido vegetal fresco foi macerado em 5 ml de solução de ácido sulfosalicílico 3% e vortexado. O sobrenadante (250 μ L) foi retirado e adicionado 500 μ L de ácido acético glacial e de solução de ninidrina 2,5% em solução de ácido acético e ácido orto fosfórico 6 M,

6:4 (v/v). Após, levado a fervura por 1 hora à 100 °C, resfriado em banho de gelo, adicionado 2 mL de tolueno, vortexada e a absorvância do sobrenadante (de tolueno) lida à 520 nm. O tolueno foi utilizado como branco para as amostras. A curva padrão foi realizada com 0,05 a 0,5 mM de prolina.

3.5 - Avaliação do Ácido Glioxílico e Amônia

A quantidade de ácido glioxílico e amônia foram realizadas com algumas modificações (BRAUTIGAM et al., 2007). Foi macerada 1,2 g de amostra e colocada em 600 µL de HCl 100 mM, seguido de 3000 µL de clorofórmio e centrifugada. A fase aquosa foi transferida para outro tubo contendo 0,150 g de carvão ativado, homegeinizada e centrifugada. O sobrenadante foi usado para quantificação de ácido glioxílico e amônio.

Para quantificação do glioxalato, 200 µL do sobrenadante foi tomado e adicionado mais 700 µL de água foi misturado com 100 µL da solução de 1% (v/v) de fenilhidrazina em HCl 100 mM. A reação foi incubada a 95°C por 3 min, congelada por 6 min e acidificada com 500 µL HCl concentrado. Uma alíquota de 900 µL foi tomada e oxidada com 100 µL de 1% $K_3Fe(CN)_6$ em água. A formação de cor foi medida exatamente 6 min após, a 520 nm. A curva padrão foi realizada com 2,4 a 14,4 µM de ácido glioxílico.

Para quantificação de amônia 50 µL do sobrenadante foi diluído 1:1 (v/v) com 100 mM HCl. Esta solução foi misturada com 1000 µL de fenol 1% e 1,5 mg % de nitroprussiato de sódio seguida da adição de 1000 uL de 1% de hipoclorito de sódio em 1,25 N de NaOH. As amostras foram incubadas a 30 °C por 45 min e as absorvâncias lidas a 620 nm. A curva padrão foi realizada com 0,11 a 0,44 mM de $(NH_4^+)_2SO_4$ como padrão.

3.6 - Determinação de Nitrogênio Total (NT)

Foram coletadas folhas nos estádios do perfilhamento e emborrachamento para determinação do nitrogênio total (NT). Após secas em estufa (65 °C), estas foram moídas em moinho modelo Willey, com peneira de diâmetro de 1 mm. 200 mg foram tomados e levados a determinação de nitrogênio total pelo método do micro-Kjeldahl (BREMNER e MULVANEY, 1982). Foram realizadas 5 repetições por tratamento para avaliação do NT.

3.7 - Componentes da Produção

Ao final do ciclo da cultura foram avaliados os seguintes componentes de produção: número médio de grãos/espiga/planta, número de espigas/planta, comprimento da espiga (cm), peso de 100 sementes (g) e rendimento de grãos. Foram consideradas seis repetições e cada vaso continha três plantas.

3.8 - Análise Estatística

Os dados foram avaliados pelo programa Genes (CRUZ, 2006), sendo submetidos à análise de variância – ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

4 - RESULTADOS

4.1 - Avaliações de parâmetros do metabolismo de carbono e nitrogênio e de respostas ao estresse

4.1.1 - CD 104

No estágio do perfilhamento observou-se que a atividade da enzima GS na condição de inoculação com *H. seropedicae* combinado com adição do fertilizante nitrogenado mostrou-se estatisticamente superior às demais condições. A condição de adição do fertilizante nitrogenado, inoculação com bactéria e controle não diferiram estatisticamente entre si, indicando sinergia entre o fertilizante e a bactéria. Já em relação ao estágio do emborrachamento observou-se que a atividade da enzima GS na condição controle foi maior que as demais condições. Observa-se que neste estágio todas as condições apresentaram valores de atividade GS menores do que no perfilhamento, exceto a condição controle (Figura 1A).

Para a enzima GDH-NADH, no perfilhamento, a condição controle e a adição do fertilizante nitrogenado foram estatisticamente maiores, enquanto as condições com inoculação com *H. seropedicae* (combinada e não combinada com adição de fertilizante nitrogenado) foram menores, apontando diminuição da atividade na presença da bactéria. No emborrachamento, a atividade desta enzima foi semelhante estatisticamente em quase todas as condições, sendo a condição com fertilizante nitrogenado a que possui menor atividade que a atividade na condição da bactéria. Entretanto as atividades no emborrachamento foram menores àquelas verificadas no estágio do perfilhamento, exceto para a condição da inoculação com a bactéria (Figura 1B).

Em ambos os estádios, a atividade da enzima ICDH-NADP apresentou comportamento igual para todas as condições avaliadas. No entanto, observa-se que as atividades no estágio do perfilhamento são maiores àquelas do emborrachamento (Figura 1C).

No perfilhamento, a atividade PAL apresentou nas condições controle, adição de fertilizante e inoculação com a bactéria valores maiores em relação à condição combinada de inoculação com a bactéria e adição do fertilizante nitrogenado, comportamento inverso ao da atividade GS. Já no emborrachamento, a atividade PAL foi menor na condição com fertilizante nitrogenado em relação às demais, que foram maiores, destacando que neste

estádio a atividade desta enzima foi maior em relação ao perfilhamento, exceto para a condição onde foi usado apenas fertilizante nitrogenado (Figura 1D).

No perfilhamento, as quantidades de prolina nas condições onde houve inoculação da bactéria foram estatisticamente maiores que as demais condições. Já no emborrachamento, o conteúdo de prolina, nas condições onde houve inoculação com a bactéria combinada com adição do fertilizante nitrogenado foi estatisticamente superior às demais condições. O conteúdo de prolina no emborrachamento apresentou valores menores quase em todas as condições em relação ao perfilhamento (Figura 2A).

Para o conteúdo de ácido glioxílico, no perfilhamento, nas condições onde a bactéria estava presente foi maior que o controle e semelhante a condição de fertilizante nitrogenado. O comportamento da atividade GDH nas condições foi inverso quando comparado aos conteúdos de prolina e ao conteúdo de ácido glioxílico. Já no emborrachamento, o conteúdo de ácido glioxílico, nas condições onde houve inoculação com a bactéria combinada com adição do fertilizante nitrogenado, foi estatisticamente superior, em relação às demais condições. Os valores de ácido glioxílico foram maiores no emborrachamento do que no perfilhamento, exceto para a condição onde houve a aplicação de N (Figura 2B).

A quantidade de nitrogênio total, no perfilhamento, nas condições em que ocorreu a adição de fertilizante nitrogenado foram maiores que o controle e a condição com a bactéria, que apresentou valor ainda menor que a do controle. No emborrachamento, o nitrogênio total quantificado apresentou maiores valores nas condições onde houve adição de fertilizante nitrogenado. Os valores de nitrogênio total no emborrachamento foram menores que o perfilhamento nas condições onde houve adição de fertilizante nitrogenado e foram iguais na condição controle e na condição onde houve a inoculação com a bactéria (Figura 2C).

O conteúdo de amônia apresentou valores maiores somente na condição combinada de inoculação com a bactéria e adição do fertilizante nitrogenado em relação às demais condições. Este resultado apresenta comportamento semelhante ao da atividade GS (Figura 1A) no estágio do perfilhamento. O conteúdo de amônia foi igual para todas as condições avaliadas no estágio do emborrachamento, sendo que neste estágio, o conteúdo de amônia foi menor em relação ao do perfilhamento (Figura 2D).

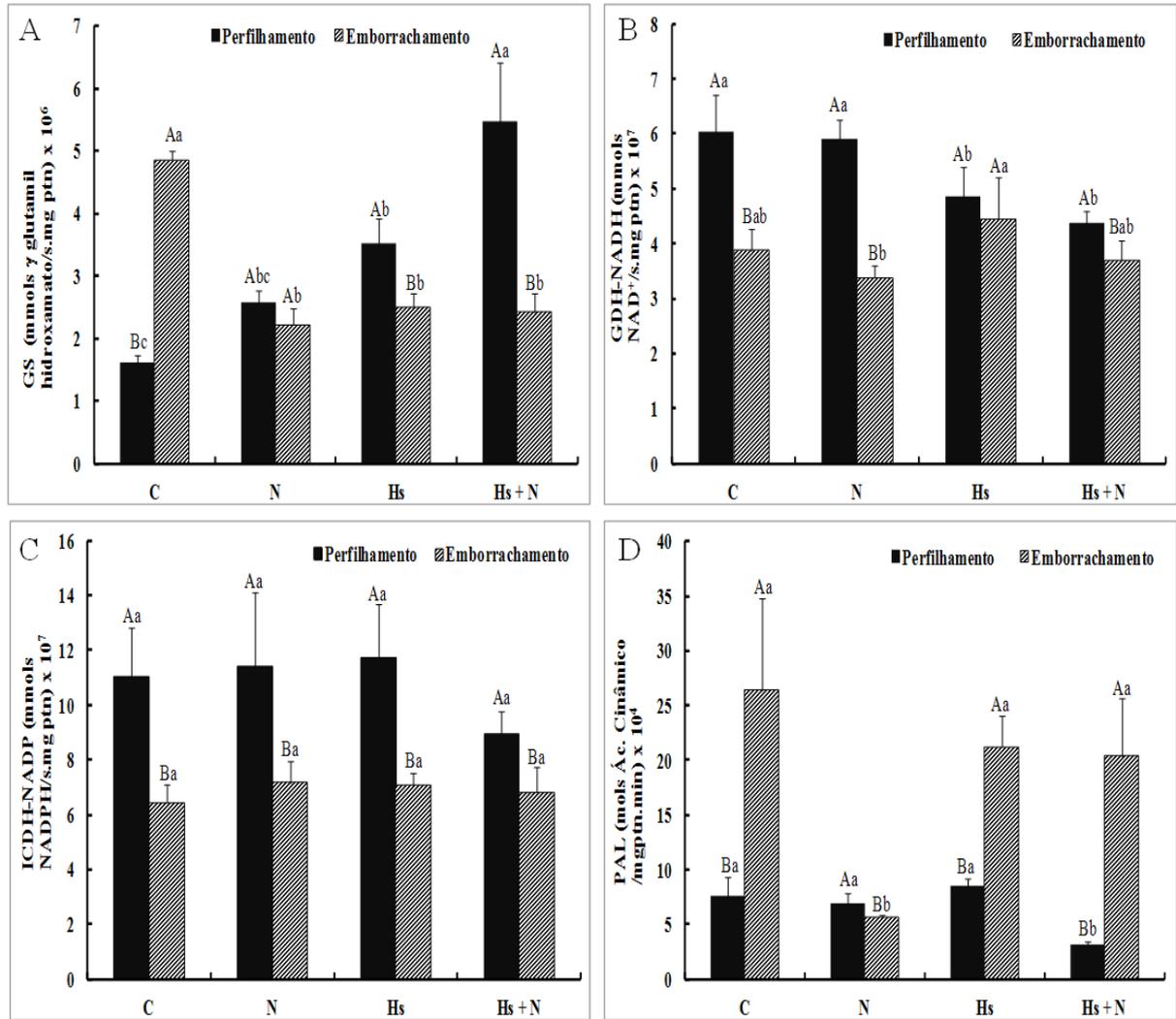


Figura 1: Atividades específicas das enzimas glutamina sintetase, GS (mmols γ glutamilhdroxamato/s.mg ptn) $\times 10^6$ (A); glutamato desidrogenase no sentido da aminação redutiva, GDH-NADH (mmols NAD⁺/s.mg ptn) $\times 10^7$ (B); isocitrato desidrogenase NADP dependente, ICDH- NADP (mmols NADPH/s.mg ptn) $\times 10^7$ (C) e fenilalanina amônia liase, PAL (mols Ác. Cinâmico/mgptn.min) $\times 10^4$ (D) nas fases do perfilhamento e emborrachamento do trigo cv. CD 104 nas condições, controle (sem inoculação ou fertilização) (C); aplicação de fertilizante nitrogenado (N); inoculação com bactéria *H. seropedicae* (Hs) e inoculação com a mesma bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N). Cada valor representa a média de quadriplicatas. Valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas, não diferem estatisticamente nas condições de inoculação e/ou fertilização no mesmo estágio fenológico e letras maiúsculas, não diferem estatisticamente entre os estádios fenológicos em cada condição de inoculação e/ou fertilização pelo Teste de Tukey ($p < 5\%$).

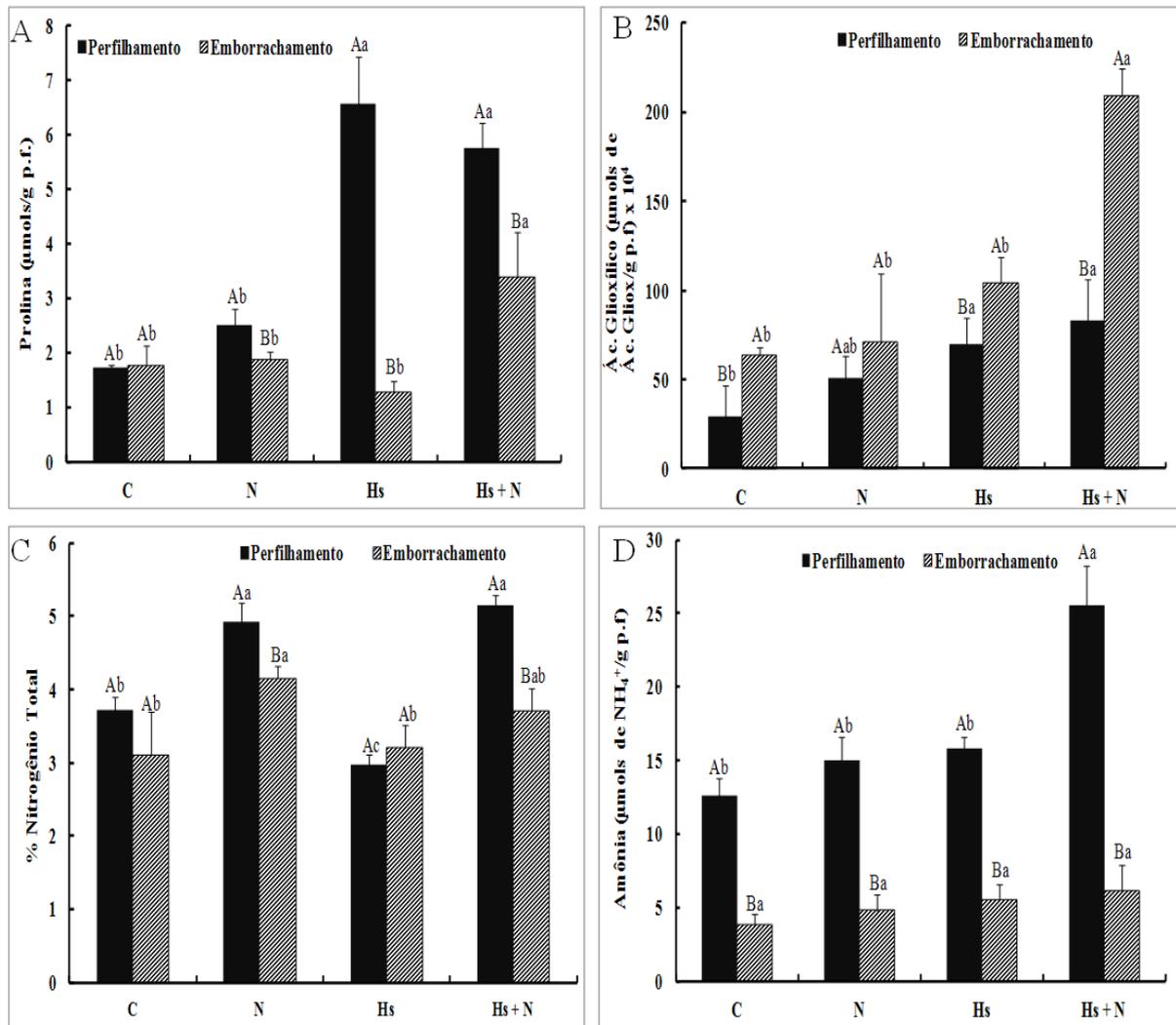


Figura 2: Conteúdo de prolina ($\mu\text{mol/g p.f.}$) (A); ácido glioxílico ($\mu\text{mol de } \text{Ác. Gliox/g p.f.} \times 10^4$) (B); % nitrogênio total (% NT) (C) e amônia ($\mu\text{mol de } \text{NH}_4^+/\text{g p.f.}$) (D) nas fases do perfilhamento e emborrachamento do trigo cv. CD 104 nas condições, controle (sem inoculação ou fertilização) (C); aplicação de fertilizante nitrogenado (N); inoculação com bactéria *H. seropedicae* (Hs) e inoculação com a mesma bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N). Cada valor representa a média de quadruplicatas. Valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas, não diferem estatisticamente nas condições de inoculação e/ou fertilização no mesmo estágio fenológico e letras maiúsculas, não diferem estatisticamente entre os estágios fenológicos em cada condição de inoculação e/ou fertilização pelo Teste de Tukey ($p < 5\%$).

4.1.2 - CD 120

No estágio do perfilhamento observou-se que a atividade da enzima GS na condição onde houve adição de fertilizante nitrogenado foi estatisticamente superior as demais condições. Já no estágio do emborrachamento, a atividade da enzima GS na condição onde houve apenas a inoculação da bactéria foi a que apresentou maior valor, diferindo estatisticamente das demais condições. As atividades do emborrachamento foram menores que o perfilhamento, exceto a condição de inoculação com *H. seropedicae* onde entre os estádios a condição se inverte (Figura 3A).

A atividade da enzima GDH-NADH, no perfilhamento, na condição controle foi estatisticamente superior às demais condições. No emborrachamento, não houve diferença significativa entre as condições. Entretanto as atividades foram maiores no estágio do emborrachamento em quase todas as condições avaliadas em relação ao perfilhamento, exceto pela condição controle onde esse padrão se inverteu (Figura 3B).

No perfilhamento, a enzima ICDH-NADP apresentou comportamento similar ao da enzima GDH-NADH, onde a atividade foi maior na condição controle do que nas demais condições. No emborrachamento, a atividade ICDH-NADP foi estatisticamente maior na condição de inoculação combinada com a adição de fertilizante nitrogenado em relação às demais condições. Essa mesma condição foi estatisticamente superior no emborrachamento em relação ao perfilhamento. Em relação ao controle, este comportamento se inverte (Figura 3C).

A atividade PAL, no perfilhamento, em todas as condições foram estatisticamente iguais. Já no estágio do emborrachamento, a atividade PAL apresentou valor menor na condição onde houve apenas a inoculação com a bactéria do que nas demais condições. Entretanto a condição combinada de inoculação com a bactéria e adição do fertilizante nitrogenado apresentou a maior atividade. No emborrachamento a atividade desta enzima foi estatisticamente maior na condição combinada de fertilizante e inoculação com a bactéria, em relação ao perfilhamento (Figura 3D).

A quantidade de prolina, no perfilhamento, foi estatisticamente superior na condição controle em relação às demais condições. Já o conteúdo de prolina, no emborrachamento, apresentou maiores valores nas condições onde houve inoculação com a bactéria (combinada e não combinada com a fertilização). As quantidades de prolina foram maiores em quase todas as condições no emborrachamento em relação ao perfilhamento, exceto a condição controle (Figura 4A).

O conteúdo de ácido glicoxílico foi igual estatisticamente em todas as condições no estádio do perfilhamento. No emborrachamento, a quantidade de ácido glicoxílico foi maior na condição controle, diferindo estatisticamente das demais. Os valores de ácido glicoxílico foram estatisticamente maiores no emborrachamento do que no perfilhamento (Figura 4B).

No perfilhamento e no emborrachamento, a quantidade de nitrogênio total nas condições em que ocorreu a adição de fertilizante nitrogenado ou em combinação com a bactéria foram maiores que à condição de controle e inoculação com bactéria. Os valores de nitrogênio total foram estatisticamente menores no emborrachamento nas condições em que ocorreu a adição de fertilizante nitrogenado de forma isolada ou combinado com a inoculação da bactéria, em relação ao perfilhamento (Figura 4C).

O conteúdo de amônia, no perfilhamento, apresentou maior valor na condição onde apenas fertilizante nitrogenado foi adicionado, semelhante ao comportamento da atividade GS (Figura 3A). Entretanto na condição onde foi inoculada a bactéria o conteúdo foi ainda menor comparada à condição controle e na condição combinada da inoculação com a bactéria e adição de fertilizante nitrogenado. Já no emborrachamento, o conteúdo de amônia foi menor na condição controle que as demais condições de fertilização e/ou inoculação. Este comportamento se assemelha inversamente ao comportamento observado para o conteúdo de ácido glicoxílico. O estádio do emborrachamento apresentou menores conteúdos de amônia em relação ao do perfilhamento, exceto para a condição onde foi realizada a inoculação com a bactéria (Figura 4D).

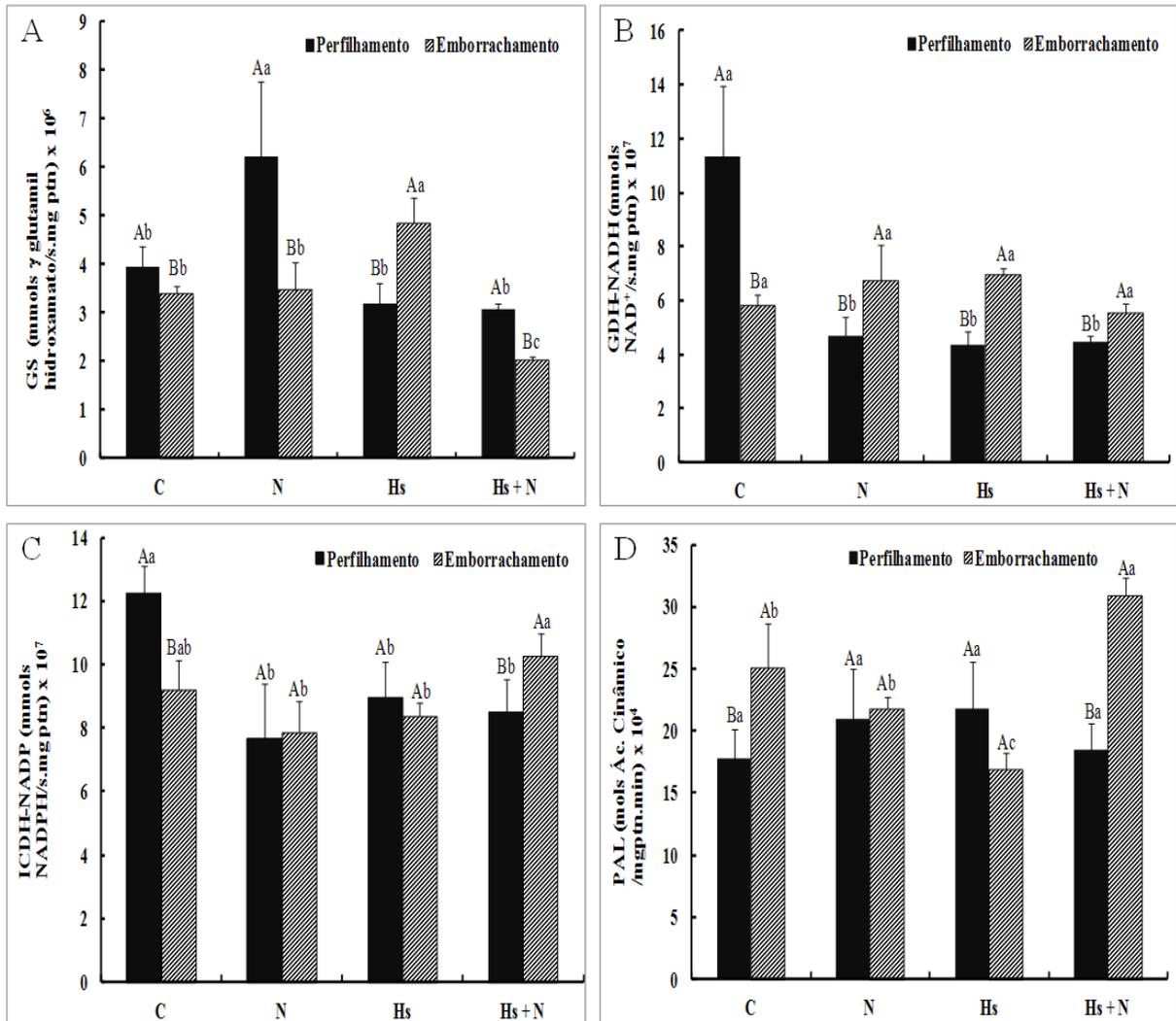


Figura 3: Atividades específicas das enzimas glutamina sintetase, GS (mmols γ glutamylhidroxamato/s.mg ptn) $\times 10^6$ (A); glutamato desidrogenase no sentido da aminação redutiva, GDH-NADH (mmols NAD⁺/s.mg ptn) $\times 10^7$ (B); isocitrato desidrogenase NADP dependente, ICDH- NADP (mmols NADPH/s.mg ptn) $\times 10^7$ (C) e fenilalanina amônia liase, PAL (mols Ác. Cinâmico/mg ptn.min) $\times 10^4$ (D) nas fases do perfilhamento e emborrachamento do trigo cv. CD 120 nas condições, controle (sem inoculação ou fertilização) (C); aplicação de fertilizante nitrogenado (N); inoculação com bactéria *H. seropedicae* (Hs) e inoculação com a mesma bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N). Cada valor representa a média de quadriplicatas. Valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas, não diferem estatisticamente nas condições de inoculação e/ou fertilização no mesmo estágio fenológico e letras maiúsculas, não diferem estatisticamente entre os estádios fenológicos em cada condição de inoculação e/ou fertilização pelo Teste de Tukey ($p < 5\%$).

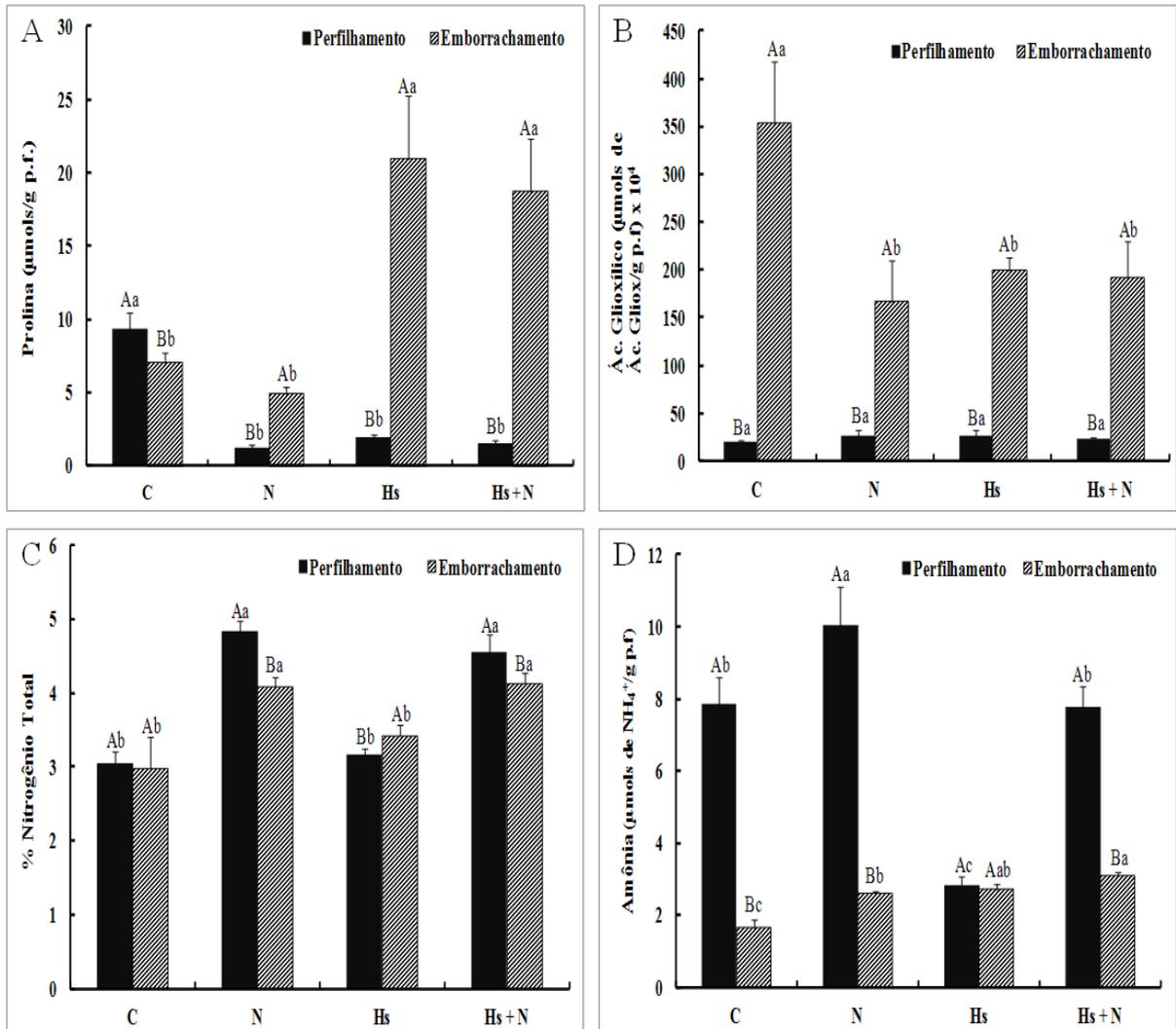


Figura 4: Conteúdo de prolina ($\mu\text{mols/g p.f.}$) (A); ácido glioxílico ($\mu\text{mols de Ác. Gliox/g p.f.} \times 10^4$) (B); % nitrogênio total (% NT) (C) e amônia ($\mu\text{mols de NH}_4^+/\text{g p.f.}$) (D) nas fases do perfilhamento e emborrachamento do trigo cv. CD 120 nas condições, controle (sem inoculação ou fertilização) (C); aplicação de fertilizante nitrogenado (N); inoculação com bactéria *H. seropedicae* (Hs) e inoculação com a mesma bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N). Cada valor representa a média de quadruplicatas. Valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas, não diferem estatisticamente nas condições de inoculação e/ou fertilização no mesmo estágio fenológico e letras maiúsculas, não diferem estatisticamente entre os estádios fenológicos em cada condição de inoculação e/ou fertilização pelo Teste de Tukey ($p < 5\%$).

4.2 - Componentes da produção

Para a cultivar CD 104, observa-se na Tabela 1, que o comprimento da espiga e o rendimento de grãos por planta não apresentaram diferença estatística entre as condições. Por outro lado, o número de grãos/espiga/planta e o peso de 100 sementes apresentam valores menores nas condições de fertilização em relação ao controle. Para o peso de 100 sementes, as condições controle e inoculação com a bactéria foram estatisticamente superiores às demais. Apenas a variável, número de espigas/planta apresentou valores de incremento positivo nas condições onde houve inoculação e também nas condições de fertilização nitrogenada quando comparadas ao controle.

Tabela 1: Componentes da produção do trigo cv. CD 104 em diferentes condições de inoculação e/ou fertilização.

Condições*	Número de espigas/planta	Comprimento da espiga (cm)	Número de grãos/espiga/planta	Peso de 100 sementes (g)	Rendimento de grão (g/planta)
C	3,3 b	9,9 a	48,2 a	2,6 a	4,0 a
N	5,1 a	10,5 a	38,0 bc	1,8 b	3,4 a
Hs	4,1 ab	10,1 a	41,6 ab	2,5 a	4,3 a
Hs + N	5,3 a	10,5 a	31,4 c	1,9 b	3,2 a

*Controle, sem inoculação ou fertilização (C); aplicação de fertilizante nitrogenado (N); inoculação com bactéria *H. seropedicae* (Hs) e inoculação com a mesma bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N). Cada valor representa média de seis repetições. Médias entre condições foram comparadas pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Tabela 2: Componentes da produção do trigo cv. CD 120 em diferentes condições de inoculação e/ou fertilização.

Condições*	Número de espigas/planta	Comprimento da espiga (cm)	Número de grãos/espiga/planta	Peso de 100 sementes (g)	Rendimento de grão (g/planta)
C	3,4 b	8,5 ab	34,5 a	2,5 a	2,4 c
N	5,9 a	8,9 a	26,4 bc	2,4 ab	3,6 ab
Hs	4,3 b	8,0 b	31,8 ab	2,2 b	2,8 bc
Hs + N	6,8 a	9,0 a	25,7 c	2,4 ab	4,0 a

*Controle, sem inoculação ou fertilização (C); aplicação de fertilizante nitrogenado (N); inoculação com bactéria *H. seropedicae* (Hs) e inoculação com a mesma bactéria combinada com a adição de fertilizante nitrogenado (Hs + N). Cada valor representa média de seis repetições. Médias entre condições foram comparadas pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Para a cultivar CD 120 observa-se na Tabela 2 que o número de espigas/planta e o comprimento de espigas somente apresentaram efeito de acréscimo pelo fertilizante nitrogenado. Entretanto o número de grãos/espiga/planta, ao contrário apresenta menor número nas condições onde houve fertilização. O número de espigas/planta, comprimento de

espigas, número de grãos/espiga/planta e rendimento de grãos na condição de inoculação com a bactéria foram estatisticamente iguais ao controle.

A variável peso de 100 sementes teve menor valor apenas na condição de inoculação com a bactéria *H. seropedicae* em relação ao controle. O rendimento de grãos mostrou que nas condições onde houve fertilização nitrogenada, os valores foram maiores em relação ao controle.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Parâmetros do metabolismo de carbono e nitrogênio e de respostas ao estresse

Em trigo já foi avaliada a GS1(citossólica) e foi observado maiores níveis de transcritos como resposta ao estresse na ausência de nitrogênio (CAPUTO et al., 2009). Neste sentido os dados obtidos quando a planta encontrava-se no estágio do emborrachamento para a cultivar CD 104 e no perfilhamento para a cultivar CD 120 corroboram com estas observações. O aumento de atividade em resposta ao estresse parece estar de acordo com o verificado para o estresse salino de menor grau em folhas de trigo. Entretanto quando o estresse é elevado, a atividade GS é reduzida e entra em substituição à enzima glutamato desidrogenase (NADH-GDH, E.C. 1.4.1.2) para a utilização da amônia e fornecimento de glutamato na síntese de prolina, importante osmoprotetor (WANG et al., 2007). Os dados obtidos neste trabalho corroboram somente para o estágio de perfilhamento na cultivar CD 120 apenas na condição controle (não inoculado ou fertilizado), o que estaria sugerindo alto índice de estresse nesta cultivar maior do que na cultivar CD 104 nesta condição.

O aumento da atividade GS observada nos períodos iniciais do desenvolvimento na cultivar CD 104 pela infecção pode estar relacionado com uma situação de estresse suave, enquanto a atividade da GDH pode ou não estar envolvida em uma situação de estresse (Figuras 1A e B).

No estágio do emborrachamento para a cultivar CD 104 a atividade GS foi baixa, indicando baixo nível de estresse e relação com maior atividade PAL (Figura 1A e D), sendo que a cultivar CD 120 neste estágio apresentou aumento de atividade GS na condição onde foi inoculada a bactéria, o que pode indicar baixo nível de estresse não acompanhado com o aumento das demais enzimas ou diminuição pelas demais enzimas (GDH-NADH, ICDH-NADP ou PAL).

O aumento da atividade GS não é visualizado nas condições de inoculação no perfilhamento para a cultivar CD 120 (Figura 3A). O efeito da indução de cádmio no estresse oxidativo no crescimento e assimilação de nitrogênio em feijão preto também foi estudado. Das folhas de plantas com 30 dias foram medidas a atividade da enzima GS em diferentes concentrações de Cd e como resultado foi visualizado que esta enzima não aumentou sua atividade frente a maior concentração de indução de Cd, mas sim diminuiu em relação ao controle (MOBIN, 2013).

As enzimas, glutamina sintetase citossólica (GS1) e glutamato desidrogenase GDH-NADH tem papel importante na reciclagem de nitrogênio durante situações de estresse, podendo se apresentar como marcadores de estresse oriundo de patógenos, presença de ácido salicílico e de espécies reativas de oxigênio envolvidas na mobilização de nitrogênio. Estudos realizados em folhas de tabaco com três semanas após infecção com vírus da Gravura do tabaco e vírus Y da batata foi observado que a atividade GS total diminui, entretanto o transcrito de GS1 aumenta na ordem de quatro vezes com relação ao controle, que era apenas água e GS2 permanece constante. Neste mesmo experimento ocorre um aumento progressivo da atividade enzimática de GS quando folhas de tabaco são submetidas à solução de 0,1 mM de ácido salicílico por 5 e 21 horas (PAGEAU et al., 2006).

No estágio do perfilhamento, nas condições onde houve inoculação e fertilização, a cultivar CD 104 apresenta aumento relativo em relação à condição controle (Figura 1A). Comparando com os dados de Pageau et al. (2006), há um pequeno estresse causado pela inoculação da bactéria nos estádios iniciais de desenvolvimento do trigo, sendo comparável ao estresse causado em folhas de tabaco com a inoculação de agentes patológicos. Já a cultivar CD 120 nas situações de inoculação apresenta diminuição que não é acompanhada de aumento da GDH-NADH, ocorrendo aumento na atividade apenas na condição de fertilização.

A atividade GDH-NADH no estágio do perfilhamento concorda com o não aumento de atividade em uma situação de estresse com menor intensidade, como observada em baixa salinidade (WANG et al., 2007) (Figura 1B). A GDH-NADH de tabaco responde aumentando sua atividade em situação de infecção viral que, pela resposta apresentada sugere ser uma situação de estresse de maior intensidade. Folhas de tabaco submetidas à solução de ácido salicílico também não mostram aumento de atividade, apesar de aumentar seus transcritos após 5 e 21 horas (PAGEAU et al., 2006).

Em plântulas de trigo com sete dias de germinação tratadas com níquel, a atividade GDH-NADH aumentou comparada ao controle. Este trabalho indica o Ni como um agente de estresse de maior intensidade (GAJEWSKA e SKLODOWSKA, 2009).

Nos estádios iniciais do trigo (perfilhamento), a GDH-NADH não diferiu entre todas as condições de inoculação/fertilização (Figura 3B). Em plântulas de cevada com 5 dias de germinação submetidas a estresse salino e diferentes fontes de N, mostrou que a atividade da GDH-NADH não foi afetada pela salinidade quando não ocorreu aplicação de nenhuma fonte de nitrogênio (OUNISSI et al., 2015), podendo assim relacionar com o não aumento da GDH na cultivar CD 120 na condição com inoculação e fertilização nitrogenada.

No emborrachamento, a cultivar CD 120 também apresenta diferença na atividade ICDH-NADP na condição combinada em relação a condição de inoculação, apontando algum nível de estresse, possivelmente atuando como fonte de carbono e reduzindo efeito do estresse da bactéria como descreve a literatura (ABIKO et al., 2005; MHAMDI et al., 2010) e, possivelmente promovendo o crescimento.

A atividade ICDH em baixa e alta condição de estresse salino descrito por Wang et al. (2007) aumenta proporcionalmente em plântulas de trigo com uma folha. A ICDH-NADPH é essencial no controle do balanço redox e contra danos oxidativos por fornecer NADPH. Esta, além de conectada ao balanço redox também está ligada ao fornecimento de 2-oxoglutarato para o metabolismo de nitrogênio e formação de glutamato e glutamina (MHAMDI e NOCTOR, 2014). Neste trabalho são mostrados altos valores desta enzima em folhas de trigo no estágio do perfilhamento indicando a percepção de desbalanceamento redox. Apesar de não haver diferença estatística este dado de ICDH concorda com as variações da atividade PAL para as condições, acentuando especialmente a alta da atividade GS, menor atividade PAL, maior atividade ICDH e maior conteúdo de amônia livre na condição combinada de inoculação com a bactéria e fertilização nitrogenada (Figuras 1 e 2). Na condição controle, a atividade da ICDH é maior por fomentar a disponibilidade de carbono (Figura 3A).

Em folhas de pimenta com 30 dias submetidas ao estresse pelo frio (8°C) por 3 dias foi visualizado que houve aumento na atividade da enzima ICDH-NADP nos primeiros dias, mas não foram observadas mudanças no terceiro dia em relação ao controle (0 dias) (AIRAKI et al., 2012).

A atividade PAL no estágio do emborrachamento foi maior em quase todas as condições (Figura 1D e 3D). Na literatura foi mostrado que a atividade PAL foi maior nos períodos de florescimento. Estudos mostram que a fase do florescimento de petúnia (*Ipomoea nil*) a atividade e expressão da PAL aumentam em resposta a nutrição deficiente assim como houve aumento do conteúdo de ácido salicílico, promovendo o florescimento. Esta enzima também responde a outros agentes estressantes, como estresse hídrico e irradiação de UV, e estes na promoção do florescimento (WADA et al., 2014). Porém, para a cv. CD 104 na condição de fertilização a atividade foi baixa.

A indução de resistência é um dos benefícios das PGPB e neste trabalho a atividade PAL é aumentada no tratamento com uma PGPB, a *H. seropedicae*, nos períodos finais do desenvolvimento (emborrachamento) (Figura 3D). A atividade PAL é aumentada em resposta a vários agentes de estresse (SCOTT et al., 2004; WADA et al., 2014).

Diferentes cultivares de pimenta obtiveram a atividade elevada quando as plantas estavam submetidas ao estresse hídrico em relação a plantas não submetidas ao estresse (PHIMCHAN et al., 2014). A PAL está relacionada à resistência imunológica em plantas. Em trigo resistente à infecção, a atividade PAL se apresentou maior do que em trigo suscetível, inclusive na inoculação com fungo. A atividade PAL também é aumentada pela indução de resistência de uma PGPB em nêspera (WANG et al., 2014). Micro-organismo biocontrolador como a levedura *Rhodosporidium paludigenum* promove a inibição de doença fúngica em frutos de mexerica. Quanto maior a expressão de genes relacionados à defesa, como a PAL e outras enzimas, menor os sintomas da doença (LU et al., 2014).

Em outro trabalho com plantas de amendoim inoculadas com duas bactérias *Bacillus* sp. e *Bradyrhizobium* sp. na indução de resistência contra o fungo patogênico *Sclerotium rolfsii*, foi avaliada a atividade PAL em 24 h e 30 dias depois da inoculação do patógeno. Relataram que a atividade PAL determinada aos 30 dias foi maior do que às 24 h após a inoculação do fungo. Nas duas vezes, um aumento significativo foi observado em plantas que tinham sido previamente inoculadas apenas com *Bacillus* sp. ou com a mistura de bactérias, em comparação com as plantas não inoculadas pelo patógeno (FIGUEREDO et al., 2014).

Os índices das atividades da GDH, ICDH e conteúdo de prolina, indicam que a condição controle é estressante e que este estresse foi mitigado pela bactéria *Herbaspirillum* para a cultivar CD 120.

Estudo em plântulas de trigo na fase inicial de desenvolvimento (14 dias) em cinco cultivares foi observado aumento do conteúdo de prolina em relação ao aumento dos níveis de estresse osmótico aplicado (-2 Bars a -8 Bars), independente da cultivar (QAYYUM et al., 2011). O aumento do conteúdo de prolina na cultivar CD 104 pode estar relacionado a uma situação de estresse causada pela inoculação no estágio do perfilhamento, sendo visível apenas nas condições onde há presença da bactéria, já no estágio do emborrachamento, essa condição passa a ser diferente (Figura 2A).

Na cultivar CD 120 no estágio do perfilhamento, o alto conteúdo de prolina no controle provavelmente pode estar relacionado a planta ter sofrido algum tipo de estresse e nas demais condições o conteúdo é menor, por talvez diminuírem esse estresse causado no controle (Figura 4A). Esse aumento do conteúdo de prolina no controle indica que as plantas estavam estressadas, concordando assim com a atividade da GDH e ICDH, mas não com a atividade da PAL, apesar da síntese de prolina ser controlada por níveis de ácido salicílico, produto da PAL (MAUCH-MANI e SLUSARENKO, 1996). Além disso, os baixos níveis de

prolina e ácido glioxílico concordam e se relacionam com baixos níveis de estresse na inoculação com a bactéria *H. seropedicae*, mostrando que a bactéria pode mitigar o efeito do estresse visto no controle para essa cultivar.

Em trabalho realizado a campo com plantas de soja sobre condições de estresse hídrico e inoculação em semente e em folhas da combinação de duas bactérias diazotróficas, *Azospirillum brasilense* e *Azotobacter chroococcum* mostrou um aumento no conteúdo de prolina, já que houve um aumento considerável tanto nas plantas submetidas ao estresse hídrico como nas plantas apenas submetidas a inoculação comparados com a condição controle (ZAKIKHANI et al., 2012).

O conteúdo de prolina em trigo apresentou-se elevado, apenas em trigo que super expressa um fator de resposta ao etileno induzido por patógeno (ZHU et al., 2014).

Em cultivares de trigo, nas fases iniciais do desenvolvimento, é mostrado o conteúdo de prolina em plantas controle e inoculadas com PGPBs. E em todas as cultivares estudadas o conteúdo de prolina apresentou aumento nas plantas inoculadas relativo ao controle, apontando um nível de estresse apenas pela inoculação (CHAKRABORTY et al., 2013).

Na literatura, outro estudo também relatou que o conteúdo de prolina em plântulas de trigo com quatro semanas sobre condições de estresse causadas por aleloquímicos, como extratos e pó de plantas, notou-se que os níveis de prolina foram maiores quando as plantas de trigo estavam submetidas ao tratamento com o pó das folhas de oleandro e nogueria (UNAL, 2013).

Plântulas de duas cultivares de trigo, uma sensível ao estresse salino e a outra não, foram submetidas ao O₃. Tais plantas mostraram aumento do conteúdo de prolina quando expostas à O₃ no tratamento sem o estresse salino (ZHENG et al., 2014).

Em um trabalho realizado com o intuito de estudar a promoção de tolerância a estresse salino e seca através de um fator de transcrição TaERF3, avaliou a prolina livre de plantas de trigo com três folhas da cultivar Yangmai 12 e de linhas transgênicas que tinham o fator de tolerância e estavam submetidas a estresse salino de 250 mM NaCl por 0h ou 20 dias. Os autores relataram que o conteúdo de prolina foi significativamente maior nas linhas de trigo que tinham o gene super expresso de tolerância do que na cultivar selvagem (RONG et al., 2014).

Plantas de trigo cultivar 711 com 30 dias de desenvolvimento foram estudadas em relação a condições de estresse salino de 0 e 100 mM de NaCl e também a aplicação exógena de H₂O₂ de 0, 50 e 100 nM. Houve um aumento do conteúdo de prolina com aplicação de H₂O₂ nos tratamentos de não salinidade e de estresse salino comparadas com o controle. Onde

não houve aplicação de H_2O_2 , o nível de prolina foi maior nas plantas que estavam estressadas em relação ao controle (ASHFAQUE et al., 2014).

Em outro trabalho realizado com plântulas de trigo, foi medida a quantidade de prolina nas folhas e raízes sobre condição de estresse por radiação UV-B, juntamente com estresse hídrico e por cádmio. Nas raízes os valores de prolina foram maiores em relação às folhas na condição de estresse hídrico com ou sem o estresse causado por radiação UV-B (KOVÁCS et al., 2014).

O maior nível de prolina no estágio do emborrachamento da cultivar CD 104 para a condição combinada de inoculação e fertilização se relacionam com altos níveis de ácido glioxílico e menor atividade de PAL, podendo estar relacionado com atraso no ciclo fenológico.

Para o conteúdo de prolina, a cultivar CD 120 se comportou de maneira diferenciada em relação a cultivar CD 104, já que não apresentou maiores níveis nos estádios iniciais de desenvolvimento e também nas condições de inoculação (QAYYUM et al., 2011), que das cinco cultivares em que foi aplicado estresse hídrico, apenas a cultivar Chakwal-50 apresentou maior conteúdo de prolina. Isso pode estar relacionado com o acúmulo do conteúdo de prolina à seleção de genótipos tolerantes (VENDRUSCOLO et al., 2007).

Uma cultivar de trigo, com plântulas de apenas oito dias submetidas ao estresse por calor foi observado que o conteúdo de prolina era maior no tratamento controle (22°C) em relação aos demais, 30°C, 35°C e 40°C por 2 horas em resposta ao tratamento de choque térmico, ocorrendo assim uma diminuição gradual no nível de prolina (KUMAR et al., 2012), corroborando assim com a cultivar CD 120 que apresentou nível de prolina maior na condição controle em relação as demais no estágio inicial de desenvolvimento.

Em outro trabalho, submeteram a cultivar CD 104 ao estresse hídrico de oito dias e observaram que o conteúdo de prolina era maior nos estádios de emborrachamento, alongamento e floração em relação ao perfilhamento em plantas estressadas. Entretanto não foi observada diferença significativa para o conteúdo de prolina em plantas não estressadas (LEMOS et al., 2011). No presente estudo, o alto teor de prolina observado nos tratamentos com a bactéria no estágio de emborrachamento indica uma percepção de estresse, como observado pela atividade PAL. Tal nível foi comparável com o obtido no estresse hídrico no mesmo estágio (Figura 4A).

No perfilhamento, a não percepção de qualquer tipo de estresse nessa fase nas condições de inoculação e de fertilização, sendo os níveis de prolina tão baixos em relação ao controle, corrobora com os dados observados por Lemos et al. (2011) em relação aos níveis de

plantas não submetidas ao estresse hídrico (Figura 4A). Este resultado concorda com o observado em trigo no mesmo estágio onde o conteúdo de prolina foi menor nas plantas inoculadas (NAVEED et al., 2014).

O sistema associado à GS/GOGAT é a principal fonte para a síntese de prolina (WANG et al., 2007). A GS2 é a principal isoforma em folhas de trigo (BERNARD et al., 2008) e na fotorespiração, que é um sistema de escape sob condição de estresse, desempenhando um importante papel na etapa limitante da reassimilação do íon amônio neste processo (HOSHIDA et al., 2000; BRESTIC et al., 2014). Esta informação concorda com os dados crescentes de ácido glioxílico observados no perfilhamento da cultivar CD 104.

Os níveis de ácido glioxílico são maiores no emborrachamento em relação ao perfilhamento. Este dado pode ser apenas uma resposta do estágio do emborrachamento em condições de estresse, já que esse estágio antecede o florescimento. Entretanto esse índice fotorespiratório para as condições avaliadas é maior no controle (Figura 4B).

A fotorespiração também tem papel importante no metabolismo de nitrogênio. Na condição controle e nas demais condições, o aumento de ácido glioxílico corrobora com a diminuição de amônia no estágio do emborrachamento para as duas cultivares, já no perfilhamento ocorre a situação oposta. O ácido glioxílico e amônia estão indicando efeito na fotorespiração na condição controle da cultivar CD 120, indicando algum nível de estresse ou desvio do metabolismo de N. Nas condições com adição de fertilizante, inoculação com a bactéria e combinada da inoculação com fertilizante esse efeito é mitigado.

Um estudo realizado *in vitro* com a cultivar CD 104 em relação à inoculação com a mesma bactéria mostrou o mesmo efeito, menor conteúdo de nitrogênio total na condição de inoculação (NEIVERTH et al., 2014). Neste estudo esta cultivar foi proposta como uma cultivar que não manteria uma boa associação com *H. seropedicae*. Entretanto, devem ser consideradas condições experimentais diferenciadas, tais como o tipo de solo onde as comunidades bacterianas se estabeleceram, a composição da matéria orgânica que foi utilizada neste trabalho ($24,61 \text{ g dm}^{-3}$, valor inferior ao apresentado por Neiverth et al., 2014) e a fonte de N que foi utilizada ser diferente. Pode-se verificar que o conteúdo de nitrogênio total no estágio do emborrachamento foi menor em relação ao perfilhamento para as duas cultivares avaliadas (Figura 2C e 4C).

A cultivar CD 120 na condição combinada fixou a mesma quantidade de nitrogênio que a condição de uso de fertilizante, enquanto que para a cultivar CD 104 foi semelhante tanto a condição de fertilização quanto a condição de inoculação. É citado na literatura que em solos ricos em nitrogênio, a FBN diminui ou não ocorre (MIA et al., 2010). A FBN não é

o único fator da promoção do crescimento. Em cana-de-açúcar, a adição de fertilizante nitrogenado e *Acetobacter diazotrophicus* PAL5 aumentou o conteúdo total de nitrogênio no final do seu ciclo fenológico (SEVILLA et al., 2001). Em tomate é observada a contribuição no teor total de nitrogênio na combinação de PGPB e fertilizante nitrogenado (ADESEMOYE et al., 2009). Resultados em trigo mostram que a associação de *Azospirillum brasilense* Sp246 e altos teores de nitrogênio diminuem o conteúdo de proteína total e os parâmetros de produtividade, tal como observado neste trabalho (OZTURK et al., 2003).

O conteúdo de amônio foi avaliado em folhas de trigo expostas a estresse salino por diferentes salinidades e foi observado que houve aumento no conteúdo de amônio nas diferentes concentrações de NaCl em relação ao controle, sendo que a concentração de 300 mM foi maior que as demais, mostrando assim que a habilidade das plantas de trigo em assimilar amônio foi reduzida sobre exposição a alta salinidade, uma condição de estresse (WANG et al., 2007).

O conteúdo de amônio foi avaliado em folhas bandeira de duas cultivares de arroz, uma selvagem e outra transgênica quando submetidas a estresse hídrico por 3 dias, mas não houve diferença entre as condições onde as plantas foram bem regadas (controle) e quando estavam em estresse hídrico (REGUERA et al., 2013), podendo assim relacionar ao resultado encontrado na cultivar CD 104, onde a condição controle e a inoculada não obtiveram diferença, mas sim foram iguais tanto no perfilhamento como no emborrachamento (Figura 2D).

A condição de fertilização nitrogenada faz com que aumente o conteúdo de nitrogênio total e amônia livre no perfilhamento da cultivar CD 120 (Figura 4C e D). O alto conteúdo de amônia no controle provavelmente é devido ao papel da GDH-NADH e não da GS, já o baixo conteúdo de amônia livre na condição de inoculação, está relacionado com a presença da bactéria. Nas condições onde houve fertilização, o alto conteúdo de amônio, corresponde ao próprio fertilizante nitrogenado.

Estes dados levam a confirmação de que há uma percepção inicial da inoculação, mas que não leva a uma efetiva associação benéfica da inoculação com *H. seropedicae* em sementes de trigo da cultivar CD 104 com certa indução de estresse e envolvimento no metabolismo de nitrogênio e que no estágio posteriormente avaliado não se percebe continuidade desta associação, possivelmente apenas seus efeitos e recuperação da planta.

A cultivar CD 120 diferentemente da cv. CD 104 no perfilhamento percebe a inoculação sem demonstrar efeitos de estresse severo e se beneficia em alguns índices pela

mitigação dos efeitos estressantes observados no controle e no emborrachamento se comporta diferentemente, aparentemente retardando seu desenvolvimento.

5.2 - Componentes da produção

O número de grãos/espiga/planta é afetado pela inoculação de modo positivo tanto para a cultivar CD 104, como para a cultivar CD 120. Apesar do elevado conteúdo de nitrogênio observado quando as plantas estavam nos estádios do perfilhamento e emborrachamento nas condições onde o fertilizante nitrogenado foi adicionado, este teve efeito negativo sobre os parâmetros da produção para a cultivar CD 104. Este dado já foi observado para esta cultivar como uma inibição da produtividade por fertilizante nitrogenado em solo rico em matéria orgânica (LEMOS et al., 2013; NEIVERTH et al., 2014).

Os efeitos sobre os componentes da produção contrastam com os efeitos observados no perfilhamento onde a inoculação da bactéria afeta o metabolismo de nitrogênio, elícita proteínas de resposta a patógenos e índices de estresse como conteúdo de prolina. Na literatura é mostrado efeitos sobre os índices de produtividade do uso de PGPB (OZTURK et al., 2003; ÇAKMAKÇI et al., 2014).

Os genótipos de trigo, em estudos com inoculação de PGPB e fertilização nitrogenada respondem diferentemente aos isolados. A cultivar CD 104 e outras cultivares mostraram respostas diversas, tendo apresentado aumento no rendimento de grãos quando inoculada na semeadura com *Azospirillum brasilense* AbV5 e o teor de matéria orgânica de $16,4 \text{ g dm}^{-3}$. Já a cultivar CD 150 não apresentou resposta significativa (LEMOS et al., 2013). Em outro trabalho a cultivar CD 150 apresenta a mesma resposta quanto a rendimento de grãos no controle e com inoculação com *Azospirillum brasilense*. Entretanto a adição de fertilizante nitrogenado proporcionou maior rendimento de grãos. Cabe ressaltar a baixa matéria orgânica de $12,3 \text{ g dm}^{-3}$ (RODRIGUES et al., 2014).

No presente trabalho é possível observar que a cultivar CD 104 não associa, porém com os efeitos na promoção do crescimento como já observado (NEIVERTH et al., 2014). Entretanto atesta que a bactéria é percebida pela planta. Ocorre efeito interessante nos componentes de produtividade que é a diminuição destes em função da fonte do fertilizante usado.

Raízes de plântulas de 3 dias da cultivar CD 104 foram avaliadas frente a interação com *Azospirillum brasilense*, e efeitos interativos foram observados como genes relacionados à absorção de nitrogênio, assimilação de nitrogênio, entre outros (CAMILIOS-NETO et al.,

2014). Entretanto a partir de experimentos *in vitro* não foi possível obter respostas definitivas para indicação do uso destas PGPB como inoculantes sem a avaliação final da interação do solo e a produtividade alcançada.

Outro estudo foi realizado sobre condições de estufa, com o intuito de avaliar 15 bactérias promotoras do crescimento vegetal e se essas possuíam o potencial para promover o crescimento e também o rendimento em trigo. Foi relatado que somente uma das 15 bactérias, a bactéria *Ps. fluorescens* cepa MKB37 pode melhorar o rendimento do trigo em relação ao aumento do peso de grãos, levando em consideração que no solo não foi adicionado nenhum fertilizante químico e que a MO= 7,5%, mesmo com um teor de matéria orgânica baixo e sem aplicação de fertilizante, ainda houve promoção do crescimento (SMYTH et al., 2011).

Neste trabalho, as duas cultivares, tanto a CD 104 quanto a CD 120 não obtiveram benefício em produtividade considerável. Entretanto a CD 120 na variável de rendimento de grão (g/planta), na condição combinada de inoculação e fertilização demonstraram vantagem na associação com a bactéria e relacionado com maiores valores de atividade de PAL e ICDH- NADP e menor valor de GS no emborrachamento.

6 - CONCLUSÃO

As cultivares de trigo CD 104 e CD 120 apresentaram interação com a *H. seropedicae* nos dois estádios de desenvolvimento do trigo.

A interação é percebida de modo diferente em termos de estresse e metabolismo de nitrogênio para as cultivares estudadas e em estádios diferentes.

A interação da bactéria, na cultivar CD 120 aparentemente diminuiu os efeitos do estresse inicial da interação enquanto que a cultivar CD 104 não.

O metabolismo de carbono e nitrogênio está relacionado com índices de estresse relacionados com a infecção por *H. seropedicae* para associação benéfica, entretanto esta associação é dependente da cultivar e do meio.

A bactéria *H. seropedicae*, capaz de associar benéficamente com trigo também apresenta padrão semelhante de interferência do metabolismo de carbono e nitrogênio e índices de estresse.

Os componentes de produção nas condições experimentais não foram significativos para demonstrar efeito deletério para as cultivares estudadas. A cultivar CD 120, tratada com fertilizante nitrogenado apresentou dados sugestivos, demonstrando que a mitigação do estresse pela bactéria no estágio de emborrachamento é uma associação benéfica.

Os resultados deste trabalho podem ser ainda mais explorados, possivelmente com emprego de análises de correlação e outros métodos de análise. Como tem indicado a literatura o metabolismo de nitrogênio e as suas associações devem ser ainda alvo de muitos estudos.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIKO, T., OBARA, M., USHIODA, A., HAYAKAWA, T., HODGES, M. e YAMAYA, T. Localization of NAD-isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in rice roots: candidates for providing carbon skeletons to NADH-glutamate synthase. **Plant Cell Physiology**, v.46, n.10, Oct, p.1724-34. 2005.

ADESEMOYE, A. O., TORBERT, H. A. e KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, v.58, n.4, p.921-929. 2009.

AHMAD, F., AHMAD, I. e KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, n.2, p.173-181. 2008.

AIRAKI, M., LETERRIER, M., MATEOS, R. M., VALDERRAMA, R., CHAKI, M., BARROSO, J. B., DEL RÍO, L. A., PALMA, J. M. e CORPAS, F. J. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. **Plant, Cell & Environment**, v.35, n.2, p.281-295. 2012.

ALLAN, W. L., CLARK, S. M., HOOVER, G. J. e SHELP, B. J. Role of plant glyoxylate reductases during stress: a hypothesis. **Biochemical Journal**, v.423, p.15-22. 2009.

APRILE, A., HAVLICKOVA, L., PANNA, R., MARÈ, C., BORRELLI, G. M., MARONE, D., PERROTTA, C., RAMPINO, P., BELLIS, L. D., CURN, V., MASTRANGELO, A. M., RIZZA, F. e CATTIVELLI, L. Different stress responsive strategies to drought and heat in two durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency. **BMC Genomics**, v.14, n.821, p.1-18. 2013.

ASHFAQUE, F., KHAN, M. I. R. e KHAN, N. A. Exogenously applied H₂O₂ promotes proline accumulation, water relations, photosynthetic efficiency and growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. **Annual Research & Review in Biology**, v.4, n.1, p.105-120. 2014.

BALDANI, J. I. e BALDANI, V. L. D. History an the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v.77, n.3, p.549-579. 2005.

BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D., SELDIN, L. e DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, n.1, January 1, 1986, p.86-93. 1986.

BALDANI, J. I., CARUSO, L., BALDANI, V. L. D., GOI, S. R. e DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5-6, p.911-922. 1997.

BALDANI, J. I., POT, L. B., KIRCHHOF, G., FALSEN, E., BALDANI, V. L. D., OLIVARES, F. L., HOSTE, B., KERSTERS, K., HARTMANN, A., GILLIS, M. e DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*]

rubrisubalbicans, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, n.3, p.802-810. 1996.

BARKER, A. V. e BRYSON, G. M. Nitrogen. In: A. V. BARKER e D. J. PILBEAM (Ed.). **Handbook of Plant Nutrition**. New York: CRC Taylor & Francis Group, 2007. p.613.

BARTELS, D. e SUNKAR, R. Drought and Salt Tolerance in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.24, n.1, 2015/04/08, p.23-58. 2005.

BASHAN, Y. e HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.1225–1228. 1998.

BATES, L. S., WALDREN, R. P. e TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v.39, n.1, p.205-207. 1973.

BERNARD, S. M. e HABASH, D. Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist** v.182, p.608-620. 2009.

BERNARD, S. M., MOLLER, A. L., DIONISIO, G., KICHEY, T., JAHN, T. P., DUBOIS, F., BAUDO, M., LOPES, M. S., TERCE-LAFORGUE, T., FOYER, C. H., PARRY, M. A., FORDE, B. G., ARAUS, J. L., HIREL, B., SCHJOERRING, J. K. e HABASH, D. Z. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Molecular Biology**, v.67, n.1-2, May, p.89-105. 2008.

BHATTACHARJEE, R. B., SINGH, A. e MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiological biotechnology**, v.80, p.199-209. 2008.

BLOEMBERG, G. V. e LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, n.4, p.343-350. 2001.

BRAUTIGAM, A., GAGNEUL, D. e WEBER, A. P. High-throughput colorimetric method for the parallel assay of glyoxylic acid and ammonium in a single extract. **Analytical Biochemistry**, v.362, n.1, Mar 1, p.151-3. 2007.

BREMNER, J. M. e MULVANEY, C. S. Nitrogen total. In: A. L. PAGE, R. H. MILLER, *et al* (Ed.). **Methods of soil analysis: Part 2, Chemical and Microbiological Properties**. Madison: American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, 1982. p.595-624.

BRESTIC, M., ZIVCAK, M., OLISOVSKA, K., SHAO, H. B., KALAJI, H. M. e ALLAKHVERDIEV, S. I. Reduced glutamine synthetase activity plays a role in control of photosynthetic responses to high light in barley leaves. **Plant Physiol Biochem**, v.81, Aug, p.74-83. 2014.

ÇAKMAKÇI, R., TURAN, M., GÜLLÜCE, M. e ŞAHİN, F. Rhizobacteria for reduced fertilizer inputs in wheat (*Triticum aestivum* spp. vulgare) and barley (*Hordeum vulgare*) on Aridisols in Turkey. **International Journal of Plant Production**, v.8 n.2, p.163-182. 2014.

CAMILIOS-NETO, D., BONATO, P., WASSEM, R., TADRA-SFEIR, M. Z., BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., VALDAMERI, G., DONATTI, L., FAORO, H., WEISS, V. A., CHUBATSU, L. S., PEDROSA, F. O. e SOUZA, E. M. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **Bmc Genomics**, v.15, n.378, p.1-13. 2014.

CAPUTO, C., CRIADO, M. V., ROBERTS, I. N., GELSO, M. A. e BARNEIX, A. J. Regulation of glutamine synthetase 1 and amino acids transport in the phloem of young wheat plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, n.5, p.335-342. 2009.

CHAKRABORTY, U., CHAKRABORTY, B. N., CHAKRABORTY, A. P. e DEY, P. L. Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, n.5, p.789-803. 2013.

COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLEMENT, C. e BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.4951-4959. 2005.

CORUZZI, G. e BUSH, D. R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant Physiology**, v.125, p.61-64. 2001.

CORUZZI, G. M. e ZHOU, L. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, n.3, p.247-253. 2001.

CREN, M. e HIREL, B. Glutamine synthetase in higher plants regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. **Plant and Cell Physiology**, v.40, n.12, January 1, 1999, p.1187-1193. 1999.

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes**. Viçosa: UFV - Universidade Federal de Viçosa, v.1. 2006. 285 p.

DÍAZ-ZORITA, M. e FERNÁNDEZ-CANIGIA, M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. **European Journal of Soil Biology**, v.45, n.1, p.3-11. 2009.

DIAZ, C., LEMAÎTRE, T., CHRIST, A., AZZOPARDI, M., KATO, Y., SATO, F., MOROT-GAUDRY, J.-F., DILY, F. L. e MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, v.147, p.1437-1449. 2008.

DIXON, R. A. e PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v.7, n.7, p.1085 - 1097. 1995.

DONATO, V. M. T. S. e ANDRADE, A. G. D. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, p.1087-1093. 2004.

DUBOIS, F., TERCÉ-LAFORGUE, T., GONZALEZ-MORO, M.-B., ESTAVILLO, J.-M., SANGWAN, R., GALLAIS, A. e HIREL, B. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, n.6-7, p.565-576. 2003.

EGAMBERDIEVA, D. e KUCHAROVA, Z. Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. **Biology and Fertility of Soils**, v.45, n.6, p.563-571. 2009.

ESPOSITO, S., GUERRIERO, G., VONA, V., DI MARTINO RIGANO, V., CARFAGNA, S. e RIGANO, C. Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: the dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.409, January 1, 2005, p.55-64. 2005.

FARINA, R., BENEDUZI, A., AMBROSINI, A., DE CAMPOS, S. B., LISBOA, B. B., WENDISCH, V., VARGAS, L. K. e PASSAGLIA, L. M. P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v.55, n.0, p.44-52. 2012.

FERRER, J. L., AUSTIN, M. B., STEWART JR, C. e NOEL, J. P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, n.3, p.356-370. 2008.

FIGUEREDO, M. S., TONELLI, M. L., TAURIAN, T., ANGELINI, J., IBAÑEZ, F., VALETTI, L., MUÑOZ, V., ANZUAY, M. S., LUDUEÑA, L. e FABRA, A. Interrelationships between *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 in the induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii* and symbiosis on peanut plants. **Journal of Biosciences**, v.39, n.5, p.877-885. 2014.

FRECHILLA, S., LASA, B., ALEU, M., JUANARENA, N., LAMSFUS, C. e APARICIO-TEJO, P. M. Short-term ammonium supply stimulates glutamate dehydrogenase activity and alternative pathway respiration in roots of pea plants. **Journal of Plant Physiology**, v.159, n.8, p.811-818. 2002.

GAJEWSKA, E. e SKLODOWSKA, M. Nickel-induced changes in nitrogen metabolism in wheat shoots. **Journal of Plant Physiology**, v.166, n.10, p.1034-1044. 2009.

GÁLVEZ, S. e GADAL, P. On the function of the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzymes in living organisms. **Plant Science**, v.105, n.1, p.1-14. 1995.

GÁLVEZ, S., LANCIEN, M. e HODGES, M. Are isocitrate dehydrogenases and 2-oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis? **Trends in Plant Science**, v.4, n.12, 2014/10/29, p.484-490. 1999.

GIANNAKOULA, A., MOUSTAKAS, M., MYLONA, P., PAPADAKIS, I. e YUPSANIS, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v.165, n.4, p.385-396. 2008.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, n.2, p.109-117. 1995.

GLICK. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica (Cairo)**, v.2012, p.1-15. 2012.

GUTIERREZ, R., LEJAY, L., DEAN, A., CHIAROMONTE, F., SHASHA, D. e CORUZZI, G. Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*. **Genome Biology**, v.8, n.1, p.R7. 2007.

HAAS, D., BLUMER, C. e KEEL, C. Biocontrol ability of fluorescent *Pseudomonas* genetically dissected: importance of positive feedback regulation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.11, n.3, p.290-297. 2000.

HAAS, D., KEEL, C. e REIMMANN, C. Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, n.1-4, p.385-395. 2002.

HARE, P. D. e CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v.21, n.2, p.79-102. 1997.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, n.2, Aug, p.422-7. 1972.

HIREL, B. e LEA, P. J. The Molecular Genetics of Nitrogen Use Efficiency in Crops. In: (Ed.). **The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops**: Wiley-Blackwell, 2011. p.139-164.

HIREL, B., TÉTU, T., LEA, P. J. e DUBOIS, F. Improving nitrogen use efficiency in crops for sustainable agriculture. **Sustainability**, v.3, n.9, p.1452-1485. 2011.

HIRT, H. **Plant Stress Biology: From Genomics to Systems Biology**. Wiley, West Sussex. 2009.

HODGES, M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. **Journal of experimental botany**, v.53, n.370, Apr, p.905-16. 2002.

HODGES, M., FLESCH, V., GÁLVEZ, S. e BISMUTH, E. Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, n.6-7, p.577-585. 2003.

HOSHIDA, H., TANAKA, Y., HIBINO, T., HAYASHI, Y., TANAKA, A., TAKABE, T. e TAKABE, T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant Molecular Biology**, v.43, n.1, p.103-111. 2000.

HUANG, J., GU, M., LAI, Z., FAN, B., SHI, K., ZHOU, Y.-H., YU, J.-Q. e CHEN, Z. Functional Analysis of the *Arabidopsis* PAL Gene Family in Plant Growth, Development, and Response to Environmental Stress. **Plant Physiology**, v.153, n.4, August 1, 2010, p.1526-1538. 2010.

JALEEL, C. A., MANIVANNAN, P., LAKSHMANAN, G. M. A., SRIDHARAN, R. e PANNEERSELVAM, R. NaCl as a physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. **Comptes Rendus Biologies**, v.330, n.11, p.806-813. 2007.

JONES, J. D. G. e DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v.444, n.7117, p.323-329. 2006.

KICHEY, T., HEUMEZ, E., POCHOLLE, D., PAGEAU, K., VANACKER, H., DUBOIS, F., LE GOUIS, J. e HIREL, B. Combined agronomic and physiological aspects of nitrogen management in wheat highlight a central role for glutamine synthetase. **New Phytologist**, v.169, n.2, p.265-278. 2006.

KINOSHITA, H., NAGASAKI, J., YOSHIKAWA, N., YAMAMOTO, A., TAKITO, S., KAWASAKI, M., SUGIYAMA, T., MIYAKE, H., WEBER, A. P. e TANIGUCHI, M. The chloroplastic 2-oxoglutarate/malate transporter has dual function as the malate valve and in carbon/nitrogen metabolism. **Plant Journal**, v.65, n.1, Jan, p.15-26. 2011.

KIRCHHOF, G., ECKERT, B., STOFFELS, M., BALDANI, J. I., REIS, V. M. e HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.157-168. 2001.

KISHOR, P. B. K., SANGAM, S., AMRUTHA, R. N., SRI LAXMI, P., NAIDU, K. R., RAO, K. R. S. S., RAO, S., REDDY, K. J., THERIAPPAN, P. e SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v.88, n.3, p.424-438. 2005.

KLUGE, R. A., TEZOTTO-ULIANA, J. V. e DA SILVA, P. P. M. Aspectos Fisiológicos e Ambientais da Fotossíntese. **Revista Virtual de Química** v.7, n.1, p.56-73. 2015.

KOVACIK, J. e KLEJDUS, B. Tissue and method specificities of phenylalanine ammonia-lyase assay. **J Plant Physiol**, v.169, n.13, Sep 1, p.1317-20. 2012.

KOVÁCS, V., GONDOR, O. K., SZALAI, G., MAJLÁTH, I., JANDA, T. e PÁL, M. UV-B radiation modifies the acclimation processes to drought or cadmium in wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v.100, n.0, p.122-131. 2014.

KOZAKI, A. e TAKEBA, G. Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. **Nature**, v.384, n.6609, p.557-560. 1996.

KRASENSKY, J. e JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, v.63, n.4, February 1, 2012, p.1593-1608. 2012.

KROUK, G., CRAWFORD, N. M., CORUZZI, G. M. e TSAY, Y.-F. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. **Current Opinion in Plant Biology**, v.13, n.3, p.265-272. 2010.

KUMAR, R. R., GOSWAMI, S., SHARMA, S. K., SINGH, K., GADPAYLE, K. A., KUMAR, N., RAI, G. K., SINGH, M. e RAI, R. D. Protection against heat stress in wheat involves change in cell membrane stability, antioxidant enzymes, osmolyte, H₂O₂ and transcript of heat shock protein. **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry** v.4, n.4, p.83-91. 2012.

KUSANO, M., FUKUSHIMA, A., REDESTIG, H. e SAITO, K. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.4, February 1, 2011, p.1439-1453. 2011.

LA CAMERA, S., GOUZERH, G., DHONDT, S., HOFFMANN, L., FRITIG, B., LEGRAND, M. e HEITZ, T. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. **Immunological Reviews**, v.198, n.1, p.267-284. 2004.

LEA, P. J. e MIFLIN, B. J. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, n.6-7, p.555-564. 2003.

LEHMANN, S., FUNCK, D., SZABADOS, L. e RENTSCH, D. Proline metabolism and transport in plant development. **Amino Acids**, v.39, n.4, p.949-962. 2010.

LEMOS, J. M., GUIMARÃES, V. F., VENDUSCOLO, E. C., SANTOS, M. F. e OFFEMANN, L. C. Resposta de cultivares de trigo à inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*, e à adubação nitrogenada em cobertura. **Científica**, v.41, n.2, p.189-198. 2013.

LEMOS, J. M., VENDRUSCOLO, E. C. G., SCHUSTER, I. e DOS SANTOS, M. F. Physiological and biochemical responses of wheat subjected to water deficit stress at different phenological stages of development **Journal of Agricultural Science and Technology B 1**, v.1, p.1116-1124. 2011.

LETERRIER, M., BARROSO, J., PALMA, J. e CORPAS, F. Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase in *Arabidopsis* leaves and roots. **Biologia Plantarum**, v.56, n.4, p.705-710. 2012.

LETERRIER, M., LETERRIER, M., DEL RÍO, L. A. e CORPAS, F. J. Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase of pea plants: Genomic clone characterization and functional analysis under abiotic stress conditions. **Free Radical Research**, v.41, n.2, p.191-199. 2007.

LOPES, M. S., CORTADELLAS, N., KICHEY, T., DUBOIS, F., HABASH, D. e ARAUS, J. Wheat nitrogen metabolism during grain filling: comparative role of glumes and the flag leaf. **Planta**, v.225, n.1, p.165-181. 2006.

LU, L., LIU, Y., YANG, J., AZAT, R., YU, T. e ZHENG, X. Quaternary chitosan oligomers enhance resistance and biocontrol efficacy of *Rhodosporidium paludigenum* to green mold in satsuma orange. **Carbohydrate Polymers**, v.113, n.0, p.174-181. 2014.

LUGTENBERG, B. J. J., DEKKERS, L. e BLOEMBERG, G. V. Molecular Determinants of Rhizosphere Colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p.461-490. 2001.

LYNCH, J. M. **The Rhizosphere**. Chichester, UK: Wiley-Interscience. 1990.

MANIVANNAN, P., JALEEL, C. A., SANKAR, B., KISHOREKUMAR, A., SOMASUNDARAM, R., LAKSHMANAN, G. M. A. e PANNEERSELVAM, R. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.59, n.2, p.141-149. 2007.

MANO, H. e MORISAKI, H. Endophytic Bacteria in the Rice Plant. **Microbes and Environments**, v.23, n.2, p.109-117. 2008.

MATEOS, R. M., BONILLA-VALVERDE, D., DEL RÍO, L. A., PALMA, J. M. e CORPAS, F. J. NADP-dehydrogenases from pepper fruits: effect of maturation. **Physiologia Plantarum**, v.135, n.2, p.130-139. 2009.

MAUCH-MANI, B. e SLUSARENKO, A. J. Production of Salicylic Acid Precursors Is a Major Function of Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **The Plant Cell**, v.8, p.203-212. 1996.

MAYAK, S., TIROSH, T. e GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, n.6, p.565-572. 2004.

MCCARTHY-SUÁREZ, I., GÓMEZ, M., DEL RÍO, L. A. e PALMA, J. M. Role of peroxisomes in the oxidative injury induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in leaves of pea plants. **Biologia Plantarum**, v.55, n.3, p.485-492. 2011.

MHAMDI, A., MAUVE, C., GOUIA, H., SAINDRENAN, P., HODGES, M. e NOCTOR, G. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves. **Plant, Cell & Environment**, v.33, n.7, p.1112-1123. 2010.

MHAMDI, A. e NOCTOR, G. Analysis of the roles of the *Arabidopsis* peroxisomal isocitrate dehydrogenase in leaf metabolism and oxidative stress. **Environmental and Experimental Botany**, n.0. 2014.

MIA, M., BASET, A., SHAMSUDDIN, Z. e MAHMOOD, M. Use of plant growth promoting bacteria in banana: a new insight for sustainable banana production. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.12, n.3, p.459-467. 2010.

MIFLIN, B. J. e HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **J Exp Bot**, v.53, n.370, Apr, p.979-87. 2002.

MILLER, A. J., FAN, X., SHEN, Q. e SMITH, S. J. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.1, January 1, 2008, p.111-119. 2008.

MOBIN, M. Effects of cadmium-induced oxidative stress on growth and nitrogen assimilation in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. **Journal of Agricultural Sciences** v.58, n.1, p.31-39. 2013.

MOKHELE, B., ZHAN, X., YANG, G. e ZHANG, X. Review: Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. **Canadian Journal of Plant Science**, v.92, n.3, 2015/06/25, p.399-405. 2012.

MOUTIA, J. F. Y., UMRIT, G., SAUMTALLY, A. S. e NG KEE KWONG, K. F. The role of diazotrophic bacteria in the nitrogen nutrition of sugar cane in *Mauritius*: Preliminary results. **AMAS - Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius.**, p.29-39. 2003.

MUNOZ-ROJAS, J. e CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbial ecology**, v.46, n.4, Nov, p.454-64. 2003.

NAVEED, M., HUSSAIN, M. B., ZAHIR, Z., MITTER, B. e SESSITSCH, A. Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **Plant Growth Regulation**, v.73, n.2, p.121-131. 2014.

NEIVERTH, A., DELAI, S., GARCIA, D. M., SAATKAMP, K., DE SOUZA, E. M., PEDROSA, F. D. O., GUIMARÃES, V. F., DOS SANTOS, M. F., VENDRUSCOLO, E. C. G. e DA COSTA, A. C. T. Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **European Journal of Soil Biology**, v.64, 2014/10, p.1-5. 2014.

NOWAK, J. e SHULAEV, V. Priming for transplant stress resistance in vitro propagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.39, n.2, p.107-124. 2003.

OLIVARES, F. L., BALDANI, V. L. D., REIS, V. M., BALDANI, J. I. e DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, n.3, p.197-200. 1996.

OUNISSI, A., MANAI, J., RABHI, M., GOUIA, H. e DEBOUBA, M. Nitrogen source differently regulates Barley (*Hordeum vulgare*) response to NaCl stress at seed germination and early seedling development stages. **Cereal Research Communications**, v.43, n.2, p.225-235. 2015.

OZTURK, A., CAGLAR, O. e SAHIN, F. Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.166, n.2, p.262-266. 2003.

PAGEAU, K., REISDORF-CREN, M., MOROT-GAUDRY, J.-F. e MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.3, February 2006, p.547-557. 2006.

PASCUAL, M. B., MOLINA-RUEDA, J. J., CÀNOVAS, F. M. e GALLARDO, F. Spatial distribution of cytosolic NADP⁺-isocitrate dehydrogenase in pine embryos and seedlings. **Tree Physiology**, v.28, n.12, October 1, 2008, p.1773-1782. 2008.

PAYYAVULA, R., NAVARRE, D., KUHLE, J., PANTOJA, A. e PILLAI, S. Differential effects of environment on potato phenylpropanoid and carotenoid expression. **BMC Plant Biology**, v.12, n.1, p.39. 2012.

PHIMCHAN, P., CHANTHAI, S., BOSLAND, P. W. e TECHAWONGSTIEN, S. Enzymatic changes in phenylalanine ammonia-lyase, cinnamic-4-hydroxylase, capsaicin synthase, and peroxidase activities in *Capsicum* under drought stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, n.29, 2014/11/18, p.7057-7062. 2014.

PURNELL, M., SKOPELITIS, D., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. e BOTELLA, J. Modulation of higher-plant NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of beta subunit levels. **Planta**, v.222, n.1, p.167-180. 2005.

QAYYUM, A., RAZZAQ, A., AHMAD, M. e JENKS, M. A. Water stress causes differential effects on germination indices, total soluble sugar and proline content in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.64, p.14038-14045. 2011.

REGUERA, M., PELEG, Z., ABDEL-TAWAB, Y. M., TUMIMBANG, E. B., DELATORRE, C. A. e BLUMWALD, E. Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. **Plant Physiology**, v.163, n.4, p.1609-1622. 2013.

REIS, A. R., FAVARIN, J. L., GALLO, L. A., MALAVOLTA, E., MORAES, M. F. e LAVRES JUNIOR, J. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in coffee leaves during fruit development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.315-324. 2009.

ROBERTSON, G. P. e VITOUSEK, P. M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. **Annual Review of Environment and Resources**, v.34, p.97-125. 2009.

ROBINSON, S. A., SLADE, A. P., FOX, G. G., PHILLIPS, R., RATCLIFFE, R. G. e STEWART, G. R. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. **Plant Physiol**, v.95, n.2, Feb, p.509-16. 1991.

RODRIGUES, L. F. O. S., GUIMARÃES, V. F., DA SILVA, M. B., JUNIOR, A. S. P., KLEIN, J. e DA COSTA, A. C. P. R. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.1, p.31-37. 2014.

ROESCH, L., OLIVARES, F., PEREIRA PASSAGLIA, L., SELBACH, P., DE SÁ, E. e DE CAMARGO, F. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, n.9, p.967-974. 2006.

ROJAS-TAPIAS, D., MORENO-GALVÁN, A., PARDO-DÍAZ, S., OBANDO, M., RIVERA, D. e BONILLA, R. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria

(PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Applied Soil Ecology**, v.61, n.0, p.264-272. 2012.

RONCATO-MACCARI, L. D. B., RAMOS, H. J. O., PEDROSA, F. O., ALQUINI, Y., CHUBATSU, L. S., YATES, M. G., RIGO, L. U., STEFFENS, M. B. R. e SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v.45, n.1, p.39-47. 2003.

RONG, W., QI, L., WANG, A., YE, X., DU, L., LIANG, H., XIN, Z. e ZHANG, Z. The ERF transcription factor TaERF3 promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat. **Plant Biotechnology Journal**, v.12, n.4, p.468-479. 2014.

ROTHBALLER, M., SCHMID, M., KLEIN, I., GATTINGER, A., GRUNDMANN, S. e HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and evolutionary microbiology**, v.56, n.6, June 1, 2006, p.1341-1348. 2006.

RYU, C.-M., MURPHY, J. F., MYSORE, K. S. e KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. **The Plant Journal**, v.39, n.3, p.381-392. 2004.

SALA, V. M. R., FREITAS, S. D. S., DONZELI, V. P., FREITAS, J. G., GALLO, P. B. e SILVEIRA, A. P. D. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.345-352. 2005.

SAUBIDET, M. I., FATTA, N. e BARNEIX, A. J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v.245, n.2, p.215-222. 2002.

SCHEIBLE, W.-R., MORCUENDE, R., CZECHOWSKI, T., FRITZ, C., OSUNA, D., PALACIOS-ROJAS, N., SCHINDELASCH, D., THIMM, O., UDVARDI, M. K. e STITT, M. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. **Plant Physiology**, v.136, p.2483-2499. 2004.

SCHEIBLE, W. R., KRAPP, A. e STITT, M. Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. **Plant, Cell & Environment**, v.23, n.11, p.1155-1167. 2000.

SCHMID, M. e HARTMANN, A. Molecular phylogeny and ecology of root associated diazotrophic α - and β -proteobacteria. In: C. ELMERICH e W. E. NEWTON (Ed.). **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Association**: Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2003. p.1-20,.

SCHOENBORN, L., YATES, P. S., GRINTON, B. E., HUGENHOLTZ, P. e JANSSEN, P. H. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the

phylum-level diversity of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology** v.70, n.7, p.4363-4366. 2004.

SCOTT, I. M., CLARKE, S. M., WOOD, J. E. e MUR, L. A. J. Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.135, p.1040-1049. 2004.

SEVILLA, M., BURRIS, R., GUNAPALA, N. e KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif*- mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.358-366. 2001.

SHARMA, S., VILLAMOR, J. G. e VERSLUES, P. E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. **Plant physiology**, v.157, n.1, p.292-304. 2011.

SLEATOR, R. D. e HILL, C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.49-71. 2001.

SMYTH, E. M., MCCARTHY, J., NEVIN, R., KHAN, M. R., DOW, J. M., O'GARA, F. e DOOHAN, F. M. In vitro analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, n.3, p.683-692. 2011.

SPAEPEN, S., DOBBELAERE, S., CROONENBORGHES, A. e VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v.312, n.1, p.15-23. 2008.

STITT, M. e KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant, Cell & Environment**, v.22, n.6, p.583-621. 1999.

SULPICE, R., SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A., OSORIO, S., KRAHNERT, I., STITT, M., FERNIE, A. e NUNES-NESE, A. Mild reductions in cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in lower amino acid contents and pigmentation without impacting growth. **Amino Acids**, v.39, n.4, p.1055-1066. 2010.

SWARBRECK, S. M., DEFOIN-PLATEL, M., HINDLE, M., SAQI, M. e HABASH, D. Z. New perspectives on glutamine synthetase in grasses. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.4, February 1, 2011, p.1511-1522. 2011.

SZABADOS, L. e SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in plant science**, v.15, n.2, p.89-97. 2009.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 2009. 848 p.

TERCÉ-LAFORGUE, T., BEDU, M., DARGEL-GRAFIN, C., DUBOIS, F., GIBON, Y., RESTIVO, F. M. e HIREL, B. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase: II. physiological characterization of plants overexpressing the two enzyme subunits individually

or simultaneously. **Plant and Cell Physiology**, v.54, n.10, October 1, 2013, p.1635-1647. 2013.

THOMSEN, H. C., ERIKSSON, D., MOLLER, I. S. e SCHJOERRING, J. K. Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency? **Trends in Plant Science**, v.19, n.10, 2015/07/02, p.656-663. 2014.

THUM, K. E., SHASHA, D. E., LEJAY, L. V. e CORUZZI, G. M. Light and carbon-signaling pathways. Modeling circuits of interactions. **Plant Physiology**, v.132, p.440-452. 2003.

TOBIN, A. K. e YAMAYA, T. Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. **J Exp Bot**, v.52, n.356, Apr, p.591-604. 2001.

UNAL, B. T. Effects of growth regulators on seed germination, seedling growth and some aspects of metabolism of wheat under allelochemical stress. **Bangladesh Journal of Botany**, v.42, n.1, p.65-71. 2013.

URBANCZYK-WOCHNIAK, E. e FERNIE, A. R. Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.410, January 1, 2005, p.309-321. 2005.

VALDERRAMA, R., CORPAS, F. J., CARRERAS, A., GÓMEZ-RODRÍGUEZ, M. V., CHAKI, M., PEDRAJAS, J. R., FERNÁNDEZ-OCAÑA, A. N. A., DEL RÍO, L. A. e BARROSO, J. B. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. **Plant, Cell & Environment**, v.29, n.7, p.1449-1459. 2006.

VALENTINE, A. J., BENEDITO, V. A. e KANG, Y. Legume nitrogen fixation and soil abiotic stress: from physiology to genomics and beyond. In: (Ed.). **Annual Plant Reviews Volume 42**: Wiley-Blackwell, 2011. p.207-248.

VALVERDE, A., VELÁZQUEZ, E., GUTIÉRREZ, C., CERVANTES, E., VENTOSA, A. e IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.979-1983. 2003.

VAN HULTEN, M., PELSERS, M., VAN LOON, L. C., PIETERSE, C. M. J. e TON, J. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.14, April 4, 2006, p.5602-5607. 2006.

VENDRUSCOLO, E. C. G., SCHUSTER, I., PILEGGI, M., SCAPIM, C. A., MOLINARI, H. B. C., MARUR, C. J. e VIEIRA, L. G. E. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Journal of Plant Physiology**, v.164, n.10, p.1367-1376. 2007.

VIDAL, E. A. e GUTIÉRREZ, R. A. A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, n.5, p.521-529. 2008.

VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, v.3, n.1, January 1, 2010, p.2-20. 2010.

WADA, K. C., MIZUUCHI, K., KOSHIO, A., KANEKO, K., MITSUI, T. e TAKENO, K. Stress enhances the gene expression and enzyme activity of phenylalanine ammonia-lyase and the endogenous content of salicylic acid to induce flowering in pharbitis. **Journal of Plant Physiology**, v.171, n.11, Jul 1, p.895-902. 2014.

WALLSGROVE, R. M., TURNER, J. C., HALL, N. P., KENDALL, A. C. e BRIGHT, S. W. J. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase - biochemical and genetic analysis. **Plant Physiology**, v.83, p.155-158. 1987.

WANG, X., WANG, L., WANG, J., JIN, P., LIU, H. e ZHENG, Y. *Bacillus cereus* AR156-induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in loquat fruit. **PLOS ONE**, v.9, n.11, p.e112494. 2014.

WANG, Z. Q., YUAN, Y. Z., OU, J. Q., LIN, Q. H. e ZHANG, C. F. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. **Journal of Plant Physiology**, v.164, n.6, Jun, p.695-701. 2007.

WICKERT, E., MARCONDESII, J., LEMOS, M. V. e LEMOS, E. G. M. Nitrogen assimilation in Citrus based on CitEST data mining. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.810-818. 2007.

WINGLER, A., LEA, P. J., QUICK, W. P. e LEEGOOD, R. C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v.355, n.1402, October 29, 2000, p.1517-1529. 2000.

YANG, S.-L., LAN, S.-S. e GONG, M. Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v.166, n.15, p.1694-1699. 2009.

YILDIZ, M. e TERZÍ, H. Effect of NaCl stress on chlorophyll biosynthesis, proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive barley cultivars. **Journal of Agricultural Sciences**, v.19, p.79-88. 2013.

ZAKIKHANI, H., ARDAKANI, M. R., REJALI, F., GHOLAMHOSEINI, M., JOGHAN, A. K. e DOLATABADIAN, A. Influence of diazotrophic bacteria on antioxidant enzymes and some biochemical characteristics of soybean subjected to water stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v.11, n.11, p.1828-1835. 2012.

ZAMIOUDIS, C. e PIETERSE, C. M. J. Modulation of host immunity by beneficial microbes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.25, n.2, 2012/10/09, p.139-150. 2012.

ZELICOURT, A. D., AL-YOUSIF, M. e HIRT, H. Rhizosphere microbes as essential partners for plant stress tolerance. **Molecular Plant**, March 9, 2013. 2013

ZHENG, Y., CHENG, D. e SIMMONS, M. Ozone pollution effects on gas exchange, growth and biomass yield of salinity-treated winter wheat cultivars. **Science of The Total Environment**, v.499, n.0, p.18-26. 2014.

ZHOU, Y., ZHANG, C., LIN, J., YANG, Y., PENG, Y., TANG, D., ZHAO, X., ZHU, Y. e LIU, X. Over-expression of a glutamate dehydrogenase gene, MgGDH, from *Magnaporthe grisea* confers tolerance to dehydration stress in transgenic rice. **Planta**, v.241, n.3, p.727-740. 2015.

ZHU, X., QI, L., LIU, X., CAI, S., XU, H., HUANG, R., LI, J., WEI, X. e ZHANG, Z. The wheat ethylene response factor transcription factor pathogen-induced ERF1 mediates host responses to both the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia cerealis* and freezing stresses. **Plant Physiol**, v.164, n.3, Mar, p.1499-514. 2014.